

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



RELAÇÃO ENTRE O PADRÃO DE VASCULARIZAÇÃO TESTICULAR E A QUALIDADE DO
EJACULADO EM CANÍDEOS DA RAÇA RETRIEVER DO LABRADOR

MIGUEL COELHO SIMÕES BENTO

ORIENTADORA:

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

TUTOR:

Dr. Rui Domingos da Mata Lemos Ferreira

2020

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



RELAÇÃO ENTRE O PARDÃO DE VASCULARIZAÇÃO TESTICULAR E A QUALIDADE DO
EJACULADO EM CANÍDEOS DA RAÇA RETRIEVER DO LABRADOR

MIGUEL COELHO SIMÕES BENTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI:

PRESIDENTE:

Doutor José Paulo Pacheco Sales Luís

VOGAIS:

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

Doutora Ana Catarina Belejo Mora Torres

ORIENTADORA:

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

TUTOR:

Dr. Rui Domingos da Mata Lemos Ferreira

2020

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE OU DISSERTAÇÃO

Nome: Miguel Coelho Simões Bento

Título da Tese ou Dissertação: Relação entre o padrão de vascularização testicular e a qualidade do ejaculado em canídeos da raça Retriever do Labrador.

Designação do curso de Mestrado ou de Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- | | |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> Clínica | <input type="checkbox"/> Produção Animal e Segurança Alimentar |
| <input type="checkbox"/> Morfologia e Função | <input type="checkbox"/> Sanidade Animal |

Declaro sob compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- ☐ Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- ☒ Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de ☐ 6 meses, ☒ 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

*Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)


Os resultados serão utilizados na redação de um artigo científico.

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 13 de novembro de 2020.

Assinatura:



Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço à minha orientadora, Professora Luísa Mateus e ao meu tutor, Dr. Rui Lemos Ferreira pela confiança que depositaram em mim neste projeto, pelo apoio e por tudo o que me ensinaram.

Ao “Canil da Quinta das Tílias” em Palmela, em particular ao criador Sr. José Cansado, pela disponibilidade e ajuda prestada na recolha de dados para este projeto.

Ao Professor Telmo Nunes, Professor Luís Costa e ao Dr. Gonçalo Pereira pela ajuda no tratamento dos dados e análise estatística.

Aos meus colegas Bernardo e Cláudia e à Pâmela pelo companheirismo e ajuda imprescindível na avaliação das minhas amostras.

A toda a equipa do Hospital Escolar da FMV por me fazerem sentir parte da equipa, ajudarem na minha formação e por toda a vossa amizade. Um especial agradecimento ao Professor Rodolfo por ter aumentado o meu interesse pela clínica de animais de companhia. Ao Telmo que, para além de toda a amizade, teve uma paciência inigualável para me ensinar e sempre depositou uma enorme confiança em mim e no meu trabalho. Ao Martins por me aturar todos os dias e me adotar nesta jornada. Um carinho especial pelos amigos que levo comigo, Dirce, Daniela, M^a Francisca, Inês Lobo, Inês Saraiva, Soraia, Gonçalves e Sofia. A todos o meu eterno obrigado.

Aos meus colegas de estágio, sem os quais estes seis meses não teriam sido a mesma coisa, especialmente à Bia e à Patrícia que, não só foram colegas inacreditáveis, como se tornaram amigas para a vida.

Aos Zézadas, por me acompanharem nestes seis anos e sem os quais não teria conseguido completar esta etapa. Um especial agradecimento à minha companheira de todas as horas Joana, ao Chico que sempre acreditou mais em mim do que eu próprio e me acompanhou tanto nas épocas de exames como na restante vida académica, e à minha amiga Marta. Muito amor por vocês.

Ao Diogo Faria, uma das melhores pessoas que conheci em toda a minha vida e que me ensinou a aproveitar todos os bons momentos.

À Rita, Catarina, Marta, Marga e Dé um obrigado por estarem sempre lá e me puxarem para cima quando precisei.

Por último, queria agradecer à minha família. Aos meus pais, irmãos e avós por todo o amor e força que me dão todos os dias. Obrigado pela confiança e por me deixarem crescer nos meus próprios termos. Um agradecimento mais especial à minha mãe que desde sempre me incutiu o sentido de responsabilidade com a minha educação e que vezes sem conta me obrigou a sair da cama para ir aos exames.

A todos o meu sincero agradecimento, sem vocês não seria possível.

Relação entre o padrão de vascularização testicular e a qualidade do ejaculado em cães da raça Retriever do Labrador.

Resumo

A irrigação testicular apresenta um papel importante para o normal funcionamento das gónadas masculinas. Contudo, as características únicas desta microvascularização tornam os testículos suscetíveis a alterações na sua hemodinâmica que poderão culminar em problemas de fertilidade em cães. O *Doppler* permite observar e estudar o fluxo sanguíneo nos diversos órgãos e tem sido apontado como uma boa alternativa para prever a qualidade do sêmen e diagnosticar alterações vasculares, ao nível testicular, numa fase precoce. Este ensaio, apresentou como principal objetivo, estudar as características do fluxo sanguíneo ao nível da artéria testicular, obtendo os parâmetros velocidade no pico da sístole (PSV), velocidade no fim da diástole (EDV), índice de resistência (RI) e índice de pulsatilidade (PI), aferindo posteriormente a sua relação com a qualidade do ejaculado em cães. De modo a minimizar a influência da raça, tamanho e manejo dos animais foram utilizados apenas cães da raça Retriever do Labrador (n=10), de um só canil, permitindo iniciar um processo de padronização dos parâmetros estudados para a raça, tendo este sido o segundo objetivo do estudo. Ao nível da região supratesticular média e proximal, 90% e 100% dos animais apresentaram, respetivamente, padrões de onda bifásicos com resistências que variaram de intermédias a altas. Em contrapartida, ao nível distal e na região marginal, o padrão demonstrou-se monofásico e de baixa resistência, sendo consistente com o facto de os testículos necessitarem de um suprimento sanguíneo constante. Os parâmetros do *Doppler* foram similares entre as gónadas contralaterais mas foram diferentes entre as diversas regiões, sendo notada uma diminuição progressiva na velocidade do fluxo sanguíneo, assim como da resistência e pulsatilidade à medida que a artéria se aproxima do parênquima das gónadas. Ao nível da região supratesticular média e proximal, foram observadas correlações significativas positivas entre o PSV e a concentração, número total de espermatozoides (apenas na região média) e percentagem de caudas enroladas no teste hiposmótico. Conclui-se que a perfusão testicular se encontra relacionada com a função das gónadas masculinas e que, possivelmente, velocidades de fluxo sanguíneo superiores possam estar correlacionadas com uma melhor qualidade seminal. Não obstante, a realização de novos estudos nesta área permanece indispensável, sendo que a aplicabilidade destes parâmetros deve ser certificada em cães com funções testiculares comprometidas.

Palavras-chave: Artéria testicular; *Doppler*; Espermograma; Retriever do Labrador.

Relationship between the pattern of testicular vascularization and the quality of sperm in Labrador Retriever breed dogs.

Abstract

Testicular irrigation plays an essential role in the normal function of male gonads. However, the exceptional characteristics of this microvascularization make the testicles susceptible to changes in their hemodynamics, which may culminate in fertility problems in dogs. Doppler allows observing and studying blood flow in the several organs and has been pointed out as a good alternative to predict semen quality and diagnose vascular changes at the testicular level at an early stage. The main purpose of this assay was to study the characteristics of blood flow at the level of the testicular artery, obtaining the parameters peak systolic velocity (PSV), end diastolic velocity (EDV), resistivity index (RI) and pulsatility index (PI), and, subsequently, obtain its relationship with the quality of the ejaculate in dogs. In order to minimize the influence of breed, size and animal management, only Labrador Retriever dogs (n=10) of a single kennel were used, allowing to initiate a process of standardization of the parameters studied for the breed, which was the second goal of this study. At the level of the middle and proximal suprastesticular region, 90% and 100% of the animals presented, respectively, biphasic wave patterns with resistances ranging from intermediate to high. On the other hand, at the distal and marginal levels, the pattern was shown to be monophasic and low resistance, being consistent with the fact that the testicles require a constant blood supply. Doppler parameters were similar between the contralateral gonads but were shown to be different between different regions and a progressive decrease in blood flow velocity was observed, as well as resistance and pulsatility as the artery approaches the parenchyma of the gonads. At the level of the middle and proximal suprastesticular region, significant positive correlations were observed between the PSV and the concentration, the total number of spermatozoa (only in the middle region) and the percentage of tails coiled in the hyposmotic test. It is concluded that testicular perfusion is related to the function of male gonads and that, possibly, higher blood flow velocities may be correlated with better seminal quality. Nevertheless, further studies in this area remain indispensable, and the applicability of these parameters must be certified in dogs with compromised testicular functions.

Keywords: Testicular artery; Doppler; Spermogram; Labrador Retriever.

Índice

Declaração relativa às condições de reprodução da tese ou dissertação	ii
Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract.....	v
Índice.....	vi
Índice de figuras.....	viii
Índice de tabelas	ix
Índice de gráficos.....	ix
Lista de abreviaturas.....	x
1. Descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio curricular	1
2.Revisão bibliográfica	4
2.1 Função e vascularização testicular	4
2.2 Exame andrológico no cão	5
2.2.1 Anamnese e Exame físico	6
2.2.2 Exame do trato reprodutor	6
2.2.3 Avaliação do ejaculado.....	8
2.3 Ecografia e doppler testicular	11
2.4 Raça Retriever do Labrador	19
3.Relação entre o padrão de vascularização testicular e a qualidade do ejaculado em canídeos da raça retriever do Labrador.....	20
3.1 Introdução e objectivos.....	20
3.2 Materiais e métodos	21
3.2.1 População em estudo.....	22
3.2.2 Observação e palpação testicular.....	22
3.2.3 Ecografia testicular e prostática	22
3.2.4 Modo-B.....	23
3.2.5 Doppler Cor e Doppler Pulsado	24
3.2.6 Power Doppler intratesticular.....	26

3.2.7 Espermograma	26
Volume	27
Motilidade	27
Concentração e número total de espermatozoides no ejaculado	28
Vitalidade e Morfologia	29
Teste hiposmótico	30
pH	30
Bacteriologia	30
3.2.8 Análise estatística.....	31
3.3 Resultados	32
3.3.1 Caracterização da população	32
3.3.2 Ecografia Modo-B.....	32
3.3.3 Ecografia com recurso ao Doppler Cor e Doppler Pulsado	33
3.3.4 Resultados do espermograma.....	35
3.3.5 Correlação entre espermograma e ecografia modo-B	36
3.3.6 Correlação entre espermograma e valores do Doppler Pulsado	37
3.3.7 Padrão de vascularização intratesticular.....	41
3.4 Discussão.....	42
3.4.1 Avaliação ecográfica	42
3.4.2 Espermograma.....	44
3.4.3 Relação entre a ecografia modo-B e a qualidade do ejaculado	45
3.4.4 Relação entre os parâmetros do Doppler Pulsado e a qualidade do ejaculado.....	45
3.4.5 Padrão de vascularização intratesticular.....	47
3.5 Conclusão	48
4.Referências bibliográficas	49
5.Anexos	54

Índice de figuras

Figura 1 Utilização do modo-B, Doppler Cor, Doppler Pulsado e Power Doppler ao nível testicular.....	15
Figura 2 Ecografia Modo-B testicular e prostática.....	23
Figura 3 Alterações testiculares observadas à ecografia Modo-B	24
Figura 4 Utilização do Doppler ao nível da artéria testicular na sua região marginal.....	25
Figura 5 Utilização do Doppler ao nível da artéria testicular na sua região supratesticular distal.....	25
Figura 6 Utilização do Doppler ao nível da artéria testicular na sua região supratesticular média	25
Figura 7 Utilização do Doppler ao nível da artéria testicular na sua região supratesticular proximal.....	26
Figura 8 Padrão de vascularização intratesticular.....	26
Figura 9 Colheita das diferentes frações de um ejaculado para tubos graduados	27
Figura 10 Esquema representativo da câmara de Neubauer.	29

Índice de tabelas

Tabela 1	Número aproximado de horas oficiais realizadas nos diversos serviços do HEV....	3
Tabela 2	Exemplos de alterações morfológicas primárias e secundárias. Adaptado de Purswell et al. (1992); Freshman (2001); Freshman (2002); Feldman and Nelson (2004). ..	10
Tabela 3	Material utilizado para a colheita e avaliação dos ejaculados.....	27
Tabela 4	Resultados obtidos da avaliação testicular com recurso à ecografia modo-B.....	32
Tabela 5	Medianas e IIQ dos parâmetros do Doppler Pulsado obtidos nas várias regiões da artéria testicular ao nível do testículo esquerdo e direito.. ..	34
Tabela 6	Medianas e IIQ dos parâmetros avaliados através do Doppler Pulsado nas diversas regiões da artéria testicular.	35
Tabela 7	Parâmetros avaliados nos ejaculados com distribuição normal.	35
Tabela 8	Parâmetros avaliados nos ejaculados sem distribuição normal.	36
Tabela 9	Resultados do coeficiente de correlação de Spearman entre o volume testicular médio e os parâmetros do espermograma avaliados.	37
Tabela 10	Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman e valores de p entre os parâmetros avaliados no ejaculado e os parâmetros obtidos através do Doppler Pulsado na artéria testicular ao nível da sua região marginal.....	38
Tabela 11	Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman e valores de p entre os parâmetros avaliados no ejaculado e os parâmetros obtidos através do Doppler Pulsado na artéria testicular ao nível da sua região supratesticular distal.	39
Tabela 12	Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman e valores de p entre os parâmetros avaliados no ejaculado e os parâmetros obtidos através do Doppler Pulsado na artéria testicular ao nível da sua região supratesticular média.....	40
Tabela 13	Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman e valores de p entre os parâmetros avaliados no ejaculado e os parâmetros obtidos através do Doppler Pulsado na artéria testicular ao nível da sua região supratesticular proximal.	41

Índice de gráficos

Gráfico 1	Padrões das ondas dos fluxos sanguíneos observados nas várias regiões das artérias testiculares com recurso ao <i>Doppler Pulsado</i>	33
------------------	---	----

Lista de abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

EDV – Velocidade no fim da diástole

HEV- Hospital Escolar Veterinário

ICSI – Microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides

IIQ – Intervalo Interquartil

mL – Mililitros

MRP – Movimentos Retilíneos Progressivos

PAAF – Punção aspirativa de agulha fina

PI – Índice de pulsatilidade

PRF – Frequência de repetição de pulso

PSV - Velocidade no pico da sístole

RI - Índice de resistência

SPZ – espermatozoide

UFC – Unidades formadoras de colônias

% - Percentagem

1.Descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio curricular

No 11º semestre do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária teve lugar o meu estágio curricular realizado no Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. O estágio teve início no dia 2 de setembro de 2019 e foi concluído no dia 29 de fevereiro de 2020, tendo sido realizadas aproximadamente 1232 horas oficiais distribuídas pelos diversos serviços do Hospital. Os horários realizados variaram consoante o serviço, sendo realizei turnos de oito horas nas rotações de medicina geral, medicina interna, diagnóstico por imagem, oftalmologia, dermatologia, cirurgia, oncologia e na unidade de isolamento e doenças infecciosas. Os turnos diurnos, noturnos e fins-de-semana no internamento geral tiveram a duração de doze horas. A rotação de medicina geral decorreu durante sete semanas, a de diagnóstico por imagem durante três semanas (duas semanas em ecografia e uma semana em radiologia e tomografia) e o internamento geral decorreu ao longo dos seis meses de estágio. Todos os outros departamentos foram frequentados por períodos de duas semanas. Realizei o último mês de estágio com a minha orientadora, Professora Doutora Luísa Mateus no serviço de reprodução de animais de companhia, sendo que para completar as oito horas diárias neste último mês, realizei também rotações pela medicina geral e internamento geral.

De um modo geral, o estágio curricular possibilitou-me o desenvolvimento de competências práticas e teóricas na área de clínica de animais de companhia, assim como compreender o funcionamento de um hospital veterinário que dispõem de uma equipa multidisciplinar.

A rotação de medicina geral, permitiu-me o contacto com os animais e os seus tutores, desenvolvimento de capacidades de comunicação e linguagem técnica. Foi-me permitido a realização de anamneses, exames físicos e discussão com os clínicos sobre o plano de diagnóstico e tratamento a seguir em cada caso. Nesta rotação, tive também contacto com a medicina de urgência, podendo observar e aprender protocolos a realizar nestas situações.

No serviço de medicina interna, acompanhei o trabalho do Professor Doutor Rodolfo Oliveira Leal, tendo contacto com casos maioritariamente referenciados e de maior complexidade. Nesta rotação acompanhei o processo desde a recolha de uma história clínica mais pormenorizada para o problema apresentando, à execução de meios de diagnóstico complementares e concluindo com a discussão e redação do relatório final. Endoscopias digestivas altas, colonoscopias, broncoscopias com lavagem bronco-alveolar, punções de medula óssea, foram alguns dos procedimentos observados.

Em oftalmologia, pude observar o trabalho da Professora Doutora Esmeralda Delgado e da Dra. Ana Marta Amorim, que me incentivaram a desenvolver as minhas capacidades para a realização de um exame oftalmológico completo, incluindo a execução de testes

específicos como o teste de Schirmer, de fluoresceína e fundoscopia. Para além das consultas de especialidade, participei em cirurgias, como resolução cirúrgica de cataratas ou *flaps* conjuntivais.

Na rotação de dermatologia, assisti às consultas da Professora Doutora Mafalda Lourenço e do Dr. Hugo Pereira, que me permitiram realizar várias anamneses, desenvolvendo assim a minha capacidade de comunicação com os tutores. Todos os casos foram discutidos com os clínicos e concluídos com um relatório final de consulta. Ao longo do tempo despendido neste serviço realizei exames complementares como citologias cutâneas por raspagem ou fita-cola, vídeo-otoscopias, citologias auriculares, entre outros. Como estagiário desenvolvi assim conhecimentos mais extensos no campo da dermatologia, aprendendo a distinguir os diferentes tipos de lesões cutâneas e as principais apresentações das diferentes doenças.

Oncologia é um serviço no qual acompanhei o trabalho do Dr. Gonçalo Vicente e dos enfermeiros responsáveis pela realização das quimioterapias. Foi-me possibilitada a presença nas consultas de pacientes oncológicos, a discussão dos melhores protocolos de quimioterapia a implementar em cada caso e a sua execução, bem como a observação da evolução do estado clínico dos doentes.

Na unidade de isolamento e doenças infecciosas, desenvolvi competências no âmbito da infeciologia, aprendendo sobre as doenças de carácter infeccioso mais prevalentes em Portugal nos animais de companhia e sobre as medidas de segurança individuais e coletivas a adotar em cada caso. Este serviço apresenta como responsável a Professora Doutora Solange Gil.

A recolha de casos para o presente estudo, foi realizada no serviço de reprodução do Hospital Escolar, permitindo o contacto com um criador da raça Retriever do Labrador e o desenvolvimento de competências nas áreas da ecografia e reprodução animal, com a orientação da Professora Doutora Luísa Mateus e do Dr. Rui Lemos Ferreira. Nesta rotação tive ainda a possibilidade desenvolver as minhas competências teórico-práticas, tendo observado e realizado técnicas como citologia vaginal, vaginoscopia, ecografia do trato reprodutivo, seguimento de ciclos éstricos, diagnósticos de gestação, recolha de ejaculados, espermogramas e cesarianas.

No departamento de cirurgia de animais de companhia, ajudei na preparação dos animais para os procedimentos cirúrgicos, o que incluía a receção dos mesmos na sala de espera, conversa com o tutor, pesagem, cateterização, cálculo e administração de fármacos pré-anestésicos, indução anestésica, entubação, tricotomia e assepsia do campo cirúrgico. Como ajudante de cirurgia, tive a oportunidade de discutir e aprender diversas técnicas cirúrgicas, treinar a realização de suturas e realizar protocolos simples como orquiectomias

de cães e gatos. Por fim, ocorria a troca de ideias com os clínicos sobre medicações e recomendações das altas pós-cirúrgicas.

Em ecografia, radiologia e tomografia desenvolvi capacidades na área de diagnóstico por imagem, aprendendo a posicionar os animais para a realização dos diferentes exames, escolher as constantes adequadas, e comparar entre o que é normal e o que se encontra alterado. A discussão de diagnósticos diferenciais que poderiam estar na origem das alterações identificadas era, posteriormente, efetuada com os clínicos.

Durante os turnos no internamento geral, foi-me possibilitado o contacto com diversos casos clínicos, e participação na discussão entre os Médicos Veterinários do hospital sobre qual o melhor plano a seguir, permitindo assim o desenvolvimento do meu raciocínio clínico enquanto futuro Médico Veterinário. Para além do ponto referido anteriormente, existiu um grande contacto e aprendizagem com a equipa de enfermagem, tendo realizado inúmeros protocolos como, colheitas de sangue, monitorizações de animais críticos, transfusões sanguíneas, colocação de tubos de alimentação naso-esofágicos, algaliação de doentes e outros protocolos comuns num hospital veterinário.

Ao longo do estágio decorreram também formações abertas aos estagiários e discussões de artigos científicos com toda a equipa do hospital, permitindo a partilha de conhecimento e o desenvolvimento de competências fundamentais para o meu futuro profissional.

Tabela 1 Número aproximado de horas oficiais realizadas nos diversos serviços do HEV.

Medicina geral	280 horas
Medicina interna	80 horas
Imagiologia	120 horas
Unidade de isolamento e doenças infecciosas	80 horas
Oftalmologia	80 horas
Dermatologia	80 horas
Oncologia	80 horas
Cirurgia	80 horas
Internamento Geral	192 horas
Reprodução animal	160 horas (inclui horas despendidas no serviço de medicina geral e internamento geral)
Total	1232 horas

2.Revisão bibliográfica

2.1 Função e vascularização testicular

As gónadas masculinas são responsáveis pela produção de androgénios e estrogénios e pela espermatogénese que culmina na produção de espermatozoides. Estas funções do aparelho reprodutor masculino são influenciadas pelo sistema neuroendócrino e reguladas por um mecanismo de feedback negativo que envolve o hipotálamo, a hipófise anterior e os testículos (Romano and Brinsko 2013).

A produção de espermatozoides (célula haploide) a partir das espermatogónias (células diploides) presentes nos túbulos seminíferos, é um processo cíclico e sequencial, designado por espermatogénese. Este processo pode ser dividido em fase multiplicação, fase de redução cromática e, por fim, espermiogénese. As espermatogónias, situadas no epitélio germinativo, sofrem diversas divisões mitóticas originando espermatogónias tipo A ou diferenciando-se em espermatogónias tipo B. O primeiro tipo de células não se altera nem entra no processo subsequente de produção de espermatozoides, permitindo assim manter a população de células-tronco e, conseqüentemente, a capacidade do macho de produzir espermatozoides de forma contínua ao longo da vida. As espermatogónias do tipo B passam, posteriormente, por vários ciclos de divisões mitóticas e originam os espermatócitos primários que, por sua vez, se vão dividir por um processo de meiose. Na primeira divisão meiótica, reducional, um espermatócito primário origina dois espermatócitos secundários que posteriormente sofrem uma segunda divisão, equacional, originando quatro espermátides (Junqueira and Carneiro 2013; Romano and Brinsko 2013).

Espermiogénese é o nome dado à última etapa da produção dos gametas masculinos. A formação do acrossoma, condensação e alongamento do núcleo, desenvolvimento do flagelo e perda da maior parte do citoplasma, são os diversos processos que acontecem nesta fase, não ocorrendo nenhuma divisão celular. No final, o espermatozoide é constituído por uma cabeça, que contém o material genético, um acrossoma, que recobre a cabeça e contém enzimas necessárias para a penetração no oócito, uma peça intermédia, com mitocôndrias fornecedoras de energia, e pela cauda que permite os seus movimentos (Junqueira and Carneiro 2013; Romano and Brinsko 2013).

A espermatogénese é influenciada não só por hormonas, como também pela temperatura ao nível testicular e por outros fatores como, a desnutrição ou substâncias que levem a alterações nas células da linhagem espermatogénica (Junqueira and Carneiro 2013).

O ciclo espermático, intervalo entre a espermatogónia do tipo A até ao espermatozoide maduro, no cão é aproximadamente 60 dias. Conseqüentemente, qualquer alteração no ejaculado de um cão pode dever-se a um problema que tenha ocorrido nos dois meses anteriores (Romano and Brinsko 2013).

Nos cães, os testículos são irrigados pela artéria testicular que tem origem na aorta caudal e que atravessa o canal inguinal, fazendo parte do cordão espermático. Esta artéria, ao atingir os testículos, dá origem a numerosas artérias que após correrem sobre a superfície testicular vão irrigar o parênquima. A drenagem fica a cargo de um plexo de veias anastomosadas, o plexo pampiniforme. À medida que este plexo ascende pelo cordão espermático, o número de veias identificadas diminui, originando por fim uma única veia (Christiansen 1984; J. Parkinson 2019). Enquanto que a veia testicular direita se une à veia cava caudal, a veia testicular esquerda liga-se à veia renal esquerda (Evans and de Lahunta 2013).

Ao nível do cordão espermático existe ainda a artéria do ducto deferente que se origina a partir da artéria prostática que, por sua vez, corresponde a um ramo da artéria pudenda interna. Esta artéria acompanha o ducto deferente até ao epidídimo, o qual também é irrigado por ela. A veia do ducto deferente drena posteriormente o sangue para a veia ilíaca interna. Ao nível do cordão espermático a artéria do ducto deferente e a artéria testicular sofrem anastomoses (Evans and de Lahunta 2013).

As artérias e veias responsáveis pela irrigação e drenagem testicular encontram-se numa próxima aposição. Esta anatomia complexa permite a troca de calor entre as artérias e veias. Este mecanismo, juntamente com a ausência de gordura subcutânea, a localização extracorporal dos testículos dentro do saco escrotal e a sua aproximação ou afastamento do corpo do animal através do músculo cremáster e da Túnica de Dartos, permite manter a temperatura testicular vários graus inferiores à temperatura corporal, evitando alterações degenerativas ao nível dos túbulos seminíferos. Para além desta função, a extensão do comprimento da artéria testicular resulta na eliminação quase completa do pulso arterial, condição essencial para uma normal espermatogénese. É ainda possível que ocorra a troca de pequenas moléculas, como de testosterona, entre os diferentes vasos. No entanto, a importância destas trocas não é conhecida (Christiansen 1984; J. Parkinson 2019).

2.2 Exame andrológico no cão

A realização de um exame andrológico completo não inclui apenas a observação e inspeção do trato reprodutivo, mas sim do animal como um todo, pois várias doenças sistémicas podem-se repercutir ao nível reprodutivo. Apesar de ser um exame normalmente utilizado para avaliar a capacidade reprodutiva dos animais, em situações de compra e venda de reprodutores, programas de inseminação artificial e conservação de sémen, apresenta também utilidade no diagnóstico de afeções reprodutivas e posteriormente na monitorização da sua resolução (Cunha 2008; England and da Silva 2017).

2.2.1 Anamnese e Exame físico

A recolha de uma história pregressa completa deve ser o primeiro passo aquando da realização um exame andrológico. É importante recolher dados sobre o maneio dos animais, como o local onde habitam, o tipo de alimentação, o seu estatuto sanitário e fármacos administrados nos últimos meses. Variações no peso e condição corporal devem ser documentadas, assim como o início, duração e gravidade de doenças que possam ter ocorrido ou estejam a ocorrer no momento. Informações básicas, como a idade, podem ser muito úteis para o Médico Veterinário. No caso dos cães jovens, permite estimar a altura da entrada na puberdade. Por outro lado, cães geriátricos têm maior risco de desenvolver afeções ao nível do trato reprodutivo, como doenças degenerativas ou neoplásicas. Em casos de cães reprodutores é essencial a recolha de informação sobre os desempenhos reprodutivos anteriores como a frequência de cruzamentos, data da última monta ou recolha e resultados obtidos (McGowan 2019).

O exame físico geral é um passo indispensável, permitindo detetar doenças sistémicas que interfiram diretamente ou indiretamente, através de alterações hormonais, com a parte reprodutiva (Feldman and Nelson 2004; Cunha 2008). A execução adequada deste exame permite ao Médico Veterinário detetar anomalias que possam afetar a função reprodutiva dos cães no presente ou no futuro, predizer se tal alteração terá efeitos permanentes ou temporários e identificar problemas hereditários (McGowan 2019).

2.2.2 Exame do trato reprodutor

Após a realização de uma anamnese e exame físico de estado geral adequados deve ser realizado um exame específico e pormenorizado ao trato reprodutivo.

O escroto e testículos devem ser inspecionados visualmente e palpados cuidadosamente. A pele do saco escrotal deve apresentar uma escassa cobertura pilosa, ser fina, com uma espessura uniforme e não deve apresentar qualquer lesão nem aderência aos testículos. É necessário procurar sinais de inflamação ou qualquer aumento de espessura ou cicatriz que podem indicar a ocorrência de um trauma prévio. A sua palpação deve ser indolor (Cunha 2008; England and da Silva 2017).

Em relação aos testículos, é preciso confirmar a presença de ambos dentro do escroto e avaliá-los em relação ao seu tamanho, forma e consistência. Os testículos devem mover-se livremente dentro do saco escrotal, pelo que não é normal a presença de aderências. Em relação à sua posição, um dos testículos pode encontrar-se ligeiramente cranial relativamente ao outro e apresentam uma orientação dorsocaudal. O tamanho das gónadas masculinas varia entre as diferentes raças, relacionando-se com a massa corporal dos cães. Qualquer assimetria evidente deve ser documentada. Normalmente, os testículos apresentam uma

consistência firme e a sua diminuição pode indicar a presença de um processo degenerativo. Por outro lado, uma consistência dura poderá dever-se à presença de uma neoplasia. Relativamente à forma, esta deve ser oval e regular sem nódulos presentes. Analogamente ao escroto, a palpação testicular não deve ser dolorosa, sendo que a presença de dor pode ser indicativa, por exemplo, de orquite aguda ou torção testicular (Cunha 2008; England and da Silva 2017).

O epidídimo e as estruturas contidas no cordão espermático podem ser sede de várias alterações, pelo que devem ser sempre examinados. É importante ter a localização do epidídimo como referência. Este corre dorsolateralmente ao testículo, sendo que a cabeça se localiza cranialmente e a cauda caudalmente. Através da palpação deve-se atender a qualquer alteração de consistência, normalmente firme e resiliente com superfície lisa, ou de volume. Em casos de epididimites agudas, estas estruturas podem encontrar-se com um volume superior ao normal e uma consistência esponjosa. Contrariamente, em situações crónicas, normalmente apresentam uma consistência aumentada e forma nodular (Cunha 2008; McGowan 2019).

A avaliação do cordão espermático tem de ser realizada ao longo de toda a sua extensão permitindo, caso presentes, a deteção de hérnias escrotais, alterações na vasculatura, aderências ou alguma evidência de inflamação ou infeção (McGowan 2019).

Relativamente ao prepúcio, este deve cobrir totalmente o pénis quando não se encontra ereto, e para realizar um correto exame ao pénis é necessário exteriorizá-lo totalmente até aos bulbos da glande. Esta exteriorização deve ser fácil de executar e feita, idealmente, num só gesto. No cão, a presença de um ligeiro corrimento mucopurulento é considerada normal e designada por balanopostite fisiológica. É, no entanto, necessário aferir a presença de outros corrimentos anormais. Toda a extensão peniana deve ser observada e palpada, sendo importante documentar qualquer sinal de inflamação, trauma ou presença de alguma massa, laceração ou corpo estranho. A mucosa peniana deve ter uma cor rosada e ser suave à palpação (Cunha 2008; England and da Silva 2017). É ainda essencial verificar a existência de fraturas ou deformações congénitas que possam interferir na cópula (Cunha 2008).

Por fim, através do toque rectal é, normalmente, possível a avaliação do tamanho, consistência e simetria da próstata. Esta glândula é relativamente móvel, apresenta dois lobos simétricos, uma consistência firme e o seu tamanho varia consoante a raça, a idade e o peso do animal. Quando ocorre alguma alteração dos parâmetros mencionados em cima, ou o animal apresentar dor durante a manipulação, é necessário realizar uma investigação mais aprofundada recorrendo a métodos de diagnóstico complementares (Cunha 2008; England and da Silva 2017).

2.2.3 Avaliação do ejaculado

A técnica mais utilizada para recolher uma amostra de ejaculado consiste na estimulação manual do pênis, com compressões rítmicas sobre os bulbos da glândula (England and da Silva 2017; McGowan 2019), podendo ser otimizada se houver uma preparação prévia da sala onde se realiza o procedimento, sendo que esta deve ser isolada, calma e não devem existir interrupções. A presença de uma fêmea em estro, apesar de não ser indispensável, torna mais fácil o processo de recolha (Freshman 2002).

As diferentes partes do ejaculado podem ser recolhidas separadamente para diferentes tubos. A primeira fração ou pré-ejaculado apresenta normalmente um aspeto aquoso e um volume entre 0,5 mL e 5 mL. A segunda fração, rica em espermatozoides, tem normalmente um volume entre 0,5 mL e 2 mL e apresenta-se como um fluido espesso e leitoso. Por fim, a última fração, conhecida por fração prostática, apresenta também um aspeto aquoso, no entanto o seu volume pode ir aproximadamente até 30 mL (McGowan 2019).

Posteriormente à recolha, é realizada uma avaliação macroscópica e microscópica das amostras obtidas. No cão, o volume da segunda fração não está correlacionado com a qualidade do sêmen (Johnston 1991), no entanto é essencial medi-lo e anotá-lo para posteriormente ser calculado o número total de espermatozoides no ejaculado (Freshman 2002; Cunha 2008; England and da Silva 2017). Ainda ao nível macroscópico, deve-se realizar uma avaliação subjetiva da cor e aspeto da amostra. A segunda fração apresenta, normalmente, uma cor esbranquiçada e aspeto leitoso que por sua vez varia consoante a concentração de espermatozoides (Cunha 2008). No cão, a principal causa de alteração da cor do ejaculado é a contaminação com sangue em animais com hiperplasia prostática benigna (Johnston 1991).

Ao nível microscópico, a motilidade, concentração e número total de espermatozoides, vitalidade, morfologia e teste hiposmótico são passos que fazem parte de uma correta avaliação de um ejaculado.

A motilidade é o indicador de função espermática mais utilizado e reflete a competência estrutural e funcional dos espermatozoides (Peña Martínez 2004), devendo ser o primeiro parâmetro a ser analisado após a recolha da amostra e realizado com alguma brevidade, uma vez que um a dois minutos após a lâmina se encontrar no microscópio ligado a motilidade diminui significativamente (Threlfall 2003). Os espermatozoides normais devem apresentar movimentos rápidos, retilíneos e progressivos, atravessando o campo do microscópio em, aproximadamente, dois a três segundos (Threlfall 2003). Este método pode, no entanto, apresentar variações significativas não só por se tratar de uma avaliação subjetiva, mas também por depender da aptidão e experiência do operador que o realiza. Por estas razões, muitos centros de referência já recorrem a métodos computadorizados para a sua determinação (Cunha 2008; England and da Silva 2017).

Relativamente à concentração, uma avaliação normal não equivale a uma boa capacidade de fertilização uma vez que esta não é um indicador de qualidade espermática. Por outro lado, uma amostra de má qualidade obtida de um cão nervoso ou agitado pode não ser representativa (Freshman 2002). A concentração pode ser obtida através de técnicas manuais, utilizando uma câmara de Neubauer (Cunha 2008), ou através de métodos de espectrofotometria, comparação visual com padrões de opacidade e contadores de partículas eletrónicos que permitem obter uma estimativa da densidade de células espermáticas num ejaculado (Salisbury et al. 1943; McGowan 2019).

O número total de espermatozoides depende de vários fatores, incluindo o número de espermatozoides armazenados no epidídimo, a frequência de ejaculações, idade, raça e tamanho testicular (Freshman 2002; Threlfall 2003; England and da Silva 2017).

A vitalidade e morfologia são, normalmente, avaliadas num esfregaço corado com o corante supra-vital eosina-nigrosina. O corante nigrosina apresenta como função criar contraste, corando o fundo da lâmina de roxo. Por outro lado, a eosina vai corar de rosa a cabeça dos espermatozoides mortos, cujas membranas celulares danificadas permitem a entrada deste corante, enquanto que as células espermáticas vivas e com as membranas celulares intactas aparecem com cabeças brancas sobre o fundo escuro (Swanson and Bearden 1951). A morfologia dos espermatozoides correlaciona-se significativamente com os resultados das cobrições/inseminações (McGowan 2019). Oettlé (1993), demonstrou que cães que apresentavam mais de 60% de espermatozoides normais tinham uma taxa de fertilidade de 61%, enquanto que os que tinham menos de 60% apenas exibiam uma taxa de fertilidade de 13%, o que permite concluir que existe uma forte correlação entre este parâmetro e a fertilidade. Sendo certamente uma característica hereditária, a morfologia trata-se ainda de uma medida sensível para avaliar a saúde testicular, epididimária e das glândulas anexas (McGowan 2019).

As alterações morfológicas podem ser classificadas em primárias, resultantes de alterações que ocorrem durante a espermatogénese ou secundárias, que resultam de alterações na fase de maturação dos espermatozoides no epidídimo ou devido à incorreta manipulação das amostras (Feldman and Nelson 2004; England and da Silva 2017). Alguns autores consideram as alterações derivadas da colheita e processamento como alterações terciárias (England and da Silva 2017). Segundo H. Koziol e L. Armstrong (2018), vários defeitos morfológicos podem ter origens diferentes permitindo que sejam classificados como primários ou secundários. Um exemplo específico é a gota citoplasmática proximal, que pode resultar de uma perturbação na espermatogénese ou na função epididimária e, consequentemente, ser classificada como alteração primária ou secundária respetivamente. Posto isto, esta classificação não se correlaciona necessariamente com o seu efeito específico na fertilidade e, atualmente, tendo em conta a melhor compreensão da causa efeito

das várias alterações morfológicas nos espermatozoides, não se pode concluir que os defeitos primários tenham um efeito mais prejudicial na fertilidade do que os secundários, pelo que a Sociedade Americana de Teriogenologia decidiu adotar uma classificação que categoriza as alterações morfológicas como anomalias da cabeça, peça intermédia e cauda (H. Koziol and L. Armstrong 2018).

Tabela 2 Exemplos de alterações morfológicas primárias e secundárias. Adaptado de Purswell et al. (1992); Freshman (2001); Freshman (2002); Feldman and Nelson (2004).

Primárias	Secundárias
Alterações na forma da cabeça	Cabeças normais destacadas
Peça intermédia fina, espessada ou dobrada	Acrossoma destacado
Gota citoplasmática proximal	Gota citoplasmática distal
Duplicação de qualquer região	Cauda dobrada
<i>Coiled tail</i>	

De forma a estudar a integridade da membrana espermática, que é fundamental para a manutenção da viabilidade espermática e capacidade de fertilização, pode-se realizar um teste hiposmótico (Kumi-Diaka 1993; Cunha 2008). Para a realização deste teste, a solução hiposmolar pode ser uma solução à base de açúcares ou simplesmente água destilada, sendo esta última, uma alternativa mais simples e menos dispendiosa (Quintela et al. 2010).

Em condições de hiposmolaridade, as membranas íntegras realizam trocas de fluidos até que seja atingido um ponto de equilíbrio osmótico entre o meio intracelular e o meio extracelular. A absorção de água para dentro das células vai levar ao enrolamento das caudas dos espermatozoides (Cunha 2008; England and da Silva 2017).

Segundo Kumi-Diaka (1993), existe uma correlação significativa entre o enrolamento das caudas e a motilidade dos espermatozoides, o que corrobora com o facto da motilidade espermática estar dependente da integridade das membranas celulares.

Tirando os parâmetros acima referidos, é ainda possível a realização de outros testes. A medição do pH do plasma seminal ou do fluido prostático pode ser útil para a escolha do antibiótico a usar em casos de infeção. Este teste deve ser realizado com alguma brevidade e utilizando um método preciso (Freshman 2002; Threlfall 2003). Um aumento no pH do sémen pode ser indicativo de uma inflamação nos testículos, epidídimo ou próstata (Feldman and Nelson 2004).

Por fim, a realização de uma cultura bacteriana quantitativa poderá ser útil para a deteção de infeções ocultas. *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia*, *Hemophilus sp.*, *Corynebacterium sp.*, e *Moraxella sp.*, são

as bactérias que mais frequentemente infetam o trato reprodutivo por via ascendente. Apesar do papel das bactérias anaeróbias não ser totalmente conhecido, deve-se suspeitar de uma infecção por este tipo de bactérias aquando da presença de tecido gangrenoso e necrótico e falha na resposta aos antibióticos utilizados em infeções por bactérias aeróbias (Johnston 1991).

2.3 Ecografia e doppler testicular

A ecografia é um meio complementar de diagnóstico não invasivo e de relativa fácil execução, quando realizada por um operador experiente. Na área da reprodução animal tem diversas aplicações, desde a avaliação do sistema reprodutor de fêmeas e de machos, ao seguimento de ciclos éstricos, diagnóstico e acompanhamento de gestações e diagnóstico de várias doenças.

Nos cães, o estudo ecográfico da próstata e dos testículos é comum em animais com sinais clínicos de doença do trato urinário inferior, alterações gastrointestinais como tenesmo, corrimento uretral, infertilidade ou aquando de alguma alteração identificada num exame físico de rotina. Torna-se, portanto, um suplemento aos mais diversos exames complementares que podem ser realizados durante a investigação de um problema no aparelho reprodutor (Mattoon and Nyland 2015b).

A ecografia testicular permite o estudo da anatomia das diferentes estruturas, do parênquima dos órgãos e das estruturas vizinhas que possam estar relacionadas, como os linfonodos (Mattoon and Nyland 2015b). Apesar de ser uma técnica muito dependente do operador, permite fornecer imagens de qualidade das estruturas contidas no escroto e definir rapidamente se as lesões observadas são intra ou extra testiculares, apresentando ainda um baixo custo económico comparando com outros meios de diagnóstico (Lung and Sidhu 2011).

No entanto, através desta técnica, não é possível fazer a distinção exata das lesões que possam ser encontradas e não é possível distinguir um processo inflamatório de um processo neoplásico. Contudo, é possível executar de forma fácil, segura e normalmente recorrendo apenas a uma leve sedação, a recolha de amostras para citologia e cultura e sob anestesia, a recolha de amostras para histopatologia, permitindo a obtenção posterior de um diagnóstico mais definitivo. Durante a realização deste procedimento, devem ser utilizadas sondas de alta frequência (7,5 a 10MHz), de modo a obter imagens com melhor definição e maior sensibilidade para a identificação e localização de alterações subtis que possam estar presentes no parênquima dos órgãos, permitindo ao clínico, posteriormente, restringir a lista de diagnósticos diferenciais (Mattoon and Nyland 2015b; Bigliardi et al. 2019).

Na avaliação dos testículos, as sondas lineares são mais apropriadas. O operador deve proceder à tricotomia na região abdominal, sendo que ao nível do escroto deve ser evitada sempre que possível, devido à irritação e posterior auto-traumatismo que daí pode

advir. O uso de álcool ou de gel é imprescindível para aumentar o contacto entre a sonda e o corpo do animal e, consequentemente, melhorar a imagem ecográfica obtida (Mattoon and Nyland 2015b).

Por vezes é difícil, através da palpação, distinguir se os processos patológicos têm origem nos testículos ou no escroto. Esta fina camada de pele pode ser sede de processos como dermatite, neoplasias ou feridas penetrantes que se manifestam normalmente por um aumento na sua espessura. A avaliação do escroto torna-se, portanto de relativa importância aquando do estudo ecográfico (Mattoon and Nyland 2015b).

No cão, os testículos apresentam uma ecotextura média e homogénea e encontram-se envolvidos por uma fina linha hiperecogénica que corresponde à túnica visceral e albugínea. No centro de cada testículo, é possível observar o *mediastino testis* que se apresenta como uma estrutura hiperecogénica de forma linear, num plano longitudinal, ou como um foco central, num plano transversal. Na região cranial é possível examinar a cabeça do epidídimo que apresenta frequentemente uma forma triangular e uma ecogenicidade e ecotextura semelhantes ao parênquima testicular. A cabeça do epidídimo tem continuidade caudalmente com o corpo que é possível seguir até à cauda em posição dorsal e lateral aos testículos. O corpo é também isoecogénico em relação ao testículo. Por fim, a cauda do epidídimo apresenta uma ecogenicidade inferior em relação ao restante epidídimo e ao parênquima testicular, podendo mesmo ser observado como uma estrutura anecogénica em alguns animais. Esta região apresenta também uma ecotextura mais grosseira (Mattoon and Nyland 2015b).

A próstata é a única glândula acessória no cão e a sua aparência ecográfica normal varia consoante a idade dos cães e com o facto de estes serem inteiros ou castrados. Esta glândula apresenta uma forma oval e bilobada e, num cão inteiro de meia idade, apresenta normalmente um parênquima homogéneo com uma textura que pode ir de média a fina. A ecogenicidade prostática pode variar sendo, no entanto, mais comum apresentar uma ecogenicidade moderada em cães não castrados. Os seus bordos devem ser regulares e poderá ser possível identificar a cápsula prostática como uma interface hiperecogénica rodeando a glândula. A uretra prostática pode frequentemente ser observada como uma região hipoecogénica a anecogénica na linha média entre os dois lobos prostáticos. O volume da próstata pode ser obtido através da fórmula: comprimento x largura x altura x 0.524. No entanto, o seu tamanho é frequentemente obtido apenas através da medição do comprimento máximo num plano longitudinal. Em cães castrados, a sua visualização pode ser difícil, uma vez que nestes ocorre uma diminuição na ecogenicidade e tamanho da glândula prostática e esta apresenta ainda uma localização pélvica (Mattoon and Nyland 2015b; De Souza et al. 2017).

Através do doppler é possível observar e estudar o fluxo sanguíneo nos diversos órgãos, permitindo avaliar as condições fisiológicas e patológicas nos vários tecidos (Dziêcio et al. 2014; Mattoon and Nyland 2015a). A presença ou ausência de fluxo, a sua direção, velocidade e turbulência dentro dos vasos, são algumas das informações que podem ser obtidas através da utilização desta técnica (De Souza, Da Cunha Barbosa et al. 2014).

Tendo em conta a importância das características do fluxo sanguíneo e, consecutivamente, da irrigação testicular para o normal funcionamento do testículo, existem vários trabalhos nesta área. A vascularização testicular, para além de implicada no mecanismo de termorregulação, suporte nutritivo e de oxigénio, é responsável por fazer chegar as hormonas produzidas ao nível da hipófise às suas respetivas células alvo. Posteriormente, a testosterona produzida ao nível das células de Leydig é transportada para o interstício dos túbulos seminíferos e, através da circulação sanguínea, para as suas células alvo no cérebro, músculo esquelético e órgãos sexuais secundários (Sweeney et al. 1991; Junior et al. 2018).

A ecografia com recurso ao Doppler é, portanto, cada vez mais utilizada para avaliar os testículos de cães, uma vez que permite estudar e caracterizar de forma fiável o fluxo sanguíneo ao nível da artéria testicular (De Souza, Da Cunha Barbosa et al. 2014). A utilidade da avaliação da perfusão testicular através do estudo dos parâmetros do *Doppler* nesta artéria prende-se com o facto de esta ser a única fonte de irrigação dos testículos (Sweeney et al. 1991; Gloria et al. 2018). Em complemento, o *Doppler Cor* e o *Power Doppler* permitem detetar padrões de fluxo anormais ao nível testicular, acrescentando informação que poderá ser útil na distinção de lesões inflamatórias, degenerativas ou neoplásicas (Bigliardi et al. 2019).

O efeito de *Doppler* resulta das mudanças entre as frequências das ondas sonoras recebidas em comparação com as frequências emitidas, devido à interação física dos ultrassons com as células em movimento dentro dos vasos sanguíneos (Matton and Nyland 2015a).

Os princípios físicos de formação das imagens obtidas variam consoante o tipo de *Doppler* utilizado. *Doppler Pulsado* e *Doppler Contínuo*, também designados por *Doppler Espectral*, são dois dos quatro tipos reconhecidos atualmente nos quais as informações sobre a velocidade-tempo das ondas sonoras são apresentadas de uma forma quantitativa sob a formato de um gráfico e ao longo dos eixos *Y* e *X* respetivamente. No *Doppler Pulsado* existe um emissor e recetor comum e por isso o som é transmitido em pulsos, ao contrário do que acontece no *Doppler Contínuo* onde o emissor e recetor são independentes, permitindo a emissão e receção de sons de forma contínua. Estas características fazem com que no *Doppler Pulsado* seja possível aferir com precisão o local de origem dos ecos recebidos pelo tempo que estes demoram a regressar. Por outro lado, o *Doppler Continuo* permite a medição

de maiores velocidades de fluxo, mas não permite discriminar a profundidade dos ecos recebidos. Através do *Doppler* Espectral é possível quantificar parâmetros do fluxo sanguíneo, como a velocidade no pico da sístole (PSV), velocidade no fim da diástole (EDV), índice de resistência (RI) e índice de pulsatilidade (PI) (Matton and Nyland 2015a).

O PSV e o EDV refletem diretamente as velocidades do fluxo sanguíneo nos vasos ao longo do ciclo cardíaco, sendo o PSV o ponto mais alto no espectro da onda sonora observada no monitor e o EDV o ponto onde termina o ciclo (Pozor and McDonnell 2004; Brandão et al. 2018). Por outro lado, os índices RI e PI são utilizados para avaliar a elasticidade e resistência dos vasos a jusante ao local em estudo e o seu cálculo não é influenciado pelo ângulo do *Doppler* [ângulo entre a direção do feixe emitido pela sonda e o fluxo sanguíneo (Matton and Nyland 2015a)] (Brandão et al. 2018). O RI reflete a resistência ao fluxo sanguíneo causada pela rede vascular distal ao local da medição e é calculado através da fórmula: $RI = (PSV - EDV) / PSV$. Em situações normais, quando o vaso em estudo é responsável pela irrigação de estruturas que necessitam de uma perfusão sanguínea intermitente e que, por sua vez, apresentam altas resistências vasculares, são observados índices de resistência vascular elevados. Em contrapartida, vasos que irrigam órgãos que necessitam de uma perfusão contínua, como o cérebro e o rim, apresentam valores baixos de RI (Wood et al. 2010). O PI é calculado através da fórmula: $PI = (PSV - EDV) / \text{velocidade média}$; e pode ser usado para quantificar o grau de atenuação das ondas de pulso em diferentes locais de medição (Thrush 2019). Estes dois índices relacionam-se inversamente com a perfusão vascular (Brandão et al. 2018).

Os outros dois tipos, *Doppler* Cor e *Power Doppler*, apresentam as informações sobrepondo mapas de cores dos fluxos sanguíneos sobre uma escala de cinzentos bidimensional em tempo real (Matton and Nyland 2015a). No entanto, enquanto que o *Doppler* cor apresenta informação sobre a média das alterações nas frequências emitidas e recebidas ou média das velocidades dos fluxos numa determinada região, o *Power Doppler* exibe informações sobre a intensidade do sinal do *Doppler*, não disponibilizando informação sobre as velocidades. O *Power Doppler*, ao contrário do *Doppler* cor, é pouco ou nada dependente do ângulo do *Doppler* e é mais sensível para a deteção de pequenos vasos e para o estudo de fluxos mais lentos. Por outro lado, o *Doppler* de cor tem como vantagem o facto de fornecer informação sobre a direção do fluxo sanguíneo (Matton and Nyland 2015a; Hoskins and Criton 2019).

De modo a aumentar a sensibilidade da técnica ao nível da artéria testicular, deve-se utilizar uma baixa frequência de repetição de pulso (PRF), um baixo filtro e ganho de cor apropriado (Schurich et al. 2009). O PRF corresponde ao número de pulsos de ultrassons emitidos por unidade de tempo, sendo que PRF altos e baixos devem ser utilizados para estudar vasos com velocidades de fluxo altas e baixas respetivamente. Estruturas refletoras

com movimentos lentos, como as paredes dos vasos sanguíneos, emitem ecos com altas amplitudes e baixas frequências. O filtro elimina estes ecos, no entanto quando é usado de forma inapropriada, pode remover sinais de fluxos com baixas velocidades (Matton and Nyland 2015a). Ao aumentar o ganho aumenta-se a sensibilidade do *Doppler* Cor, sendo necessário alguma contenção na sua utilização, uma vez que ganhos muito elevados levam ao aparecimento de artefactos (Thrush 2019).

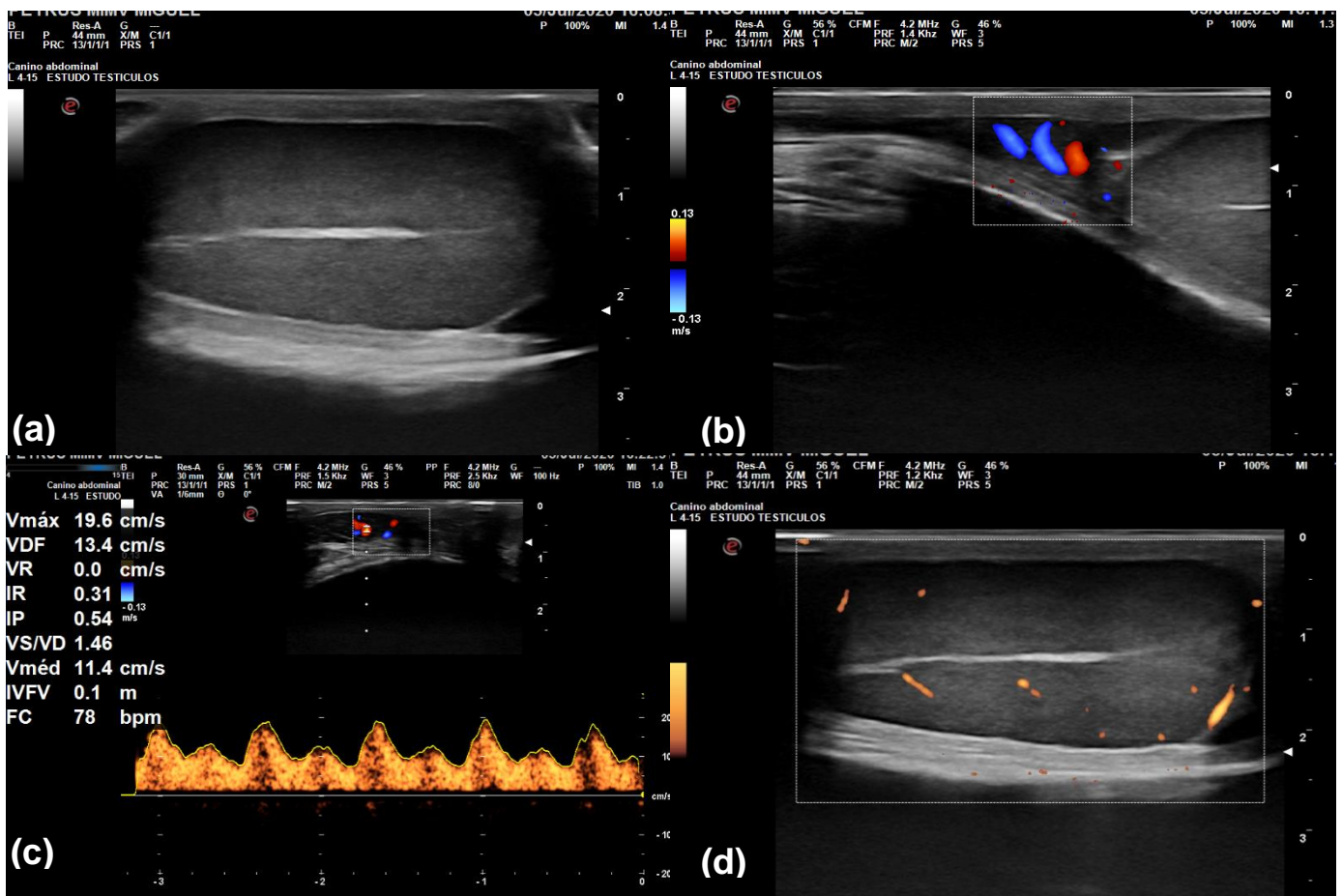


Figura 1 Utilização do modo-B, *Doppler* Cor, *Doppler* Pulsado e *Power Doppler* ao nível testicular. Em (a) um plano longitudinal testicular obtido com o modo-B. Em (b) observa-se a identificação da artéria testicular na sua região supratesticular distal com o *Doppler* Cor. Em (c) está representado o a utilização do *Doppler* Pulsado na artéria testicular nível do cordão espermático e em (d) a vascularização intratesticular obtida através do *Power Doppler*.

Ao nível do cordão espermático é detetado um fluxo sanguíneo arterial (Mattoon and Nyland 2015b). Nesta região, a artéria testicular apresenta um padrão tortuoso ao longo de todo o seu comprimento (De Souza, Da Cunha Barbosa et al. 2014; De Souza, Mota Filho et al. 2014). Esta característica, faz com que na sua avaliação *Doppler* Cor, sejam detetados fluxos sanguíneos multidirecionais, em diferentes segmentos do mesmo vaso (Carrillo et al. 2012).

Na região do epidídimo não é normalmente visualizado fluxo sanguíneo (Mattoon and Nyland 2015b). A justificação prende-se com a limitação de carácter técnico dos aparelhos de ecografia disponíveis (Günzel-Apel et al. 2001).

A artéria testicular continua dorsalmente entre o testículo e o epidídimo (Mattoon and Nyland 2015b). Nesta localização marginal, a artéria segue a curvatura testicular do polo cranial ao polo caudal do testículo, apresentando um padrão linear (De Souza, Da Cunha Barbosa et al. 2014; De Souza, Mota Filho et al. 2014). Esta particularidade faz com que durante um estudo com o *Doppler* Cor, contrariamente à sua localização no cordão espermático, o fluxo sanguíneo apresente um só sentido em relação à sonda (Carrillo et al. 2012). As características da artéria testicular ao nível da região marginal permitem a deteção de fluxo sanguíneo e a medição dos seus parâmetros de forma mais fácil comparativamente à região do cordão espermático, garantindo a obtenção de valores reprodutíveis (Günzel-Apel et al. 2001). Num estudo realizado em garanhões, os valores obtidos através do *Doppler* nesta região apresentaram-se mais intimamente correlacionados com os parâmetros de qualidade do ejaculado avaliados, o que indica, mais uma vez, esta região como a mais fiável para realizar uma avaliação com *Doppler* (Ortiz-Rodriguez et al. 2017).

Ao nível do parênquima testicular, o fluxo sanguíneo é reduzido, pelo que, geralmente, o *Doppler* Cor não é capaz de o identificar (Mattoon and Nyland 2015b). No entanto, existem estudos em cães que utilizando esta técnica, conseguiram reconhecer e analisar a artéria testicular no cordão espermático, na sua localização marginal e ainda ao nível intratesticular (De Souza, Mota Filho et al. 2014). O *Power Doppler* é, como referido anteriormente, mais sensível para a captação de fluxo em vasos de menores dimensões ou naqueles em que o fluxo é mais lento, pelo que se torna uma alternativa para o estudo do fluxo sanguíneo no parênquima (Mattoon and Nyland 2015a; Bigliardi et al. 2019).

Ao examinar a artéria testicular, é importante ter em conta que os parâmetros do fluxo sanguíneo, obtidos através do *Doppler* Espectral, podem variar consoante diferentes fatores. Em alguns estudos realizados, foram detetadas alterações entre as diferentes regiões da artéria avaliadas (Carrillo et al. 2012; De Souza, Da Cunha Barbosa et al. 2014; De Souza, Mota Filho et al. 2014; Ortiz-Rodriguez et al. 2017). Estão ainda documentadas variações nas medições de alguns dos parâmetros do *Doppler* em cães com diferentes portes (De Souza, Mota Filho et al. 2014), em carneiros consoante a altura do ano (Hedia et al. 2019) e em touros dependendo da raça (Junior et al. 2018).

A frequência cardíaca pode, possivelmente, afetar os valores obtidos na artéria testicular, uma vez que em estudos realizados em medicina humana, nas artérias renais (H. Mostbeck et al. 1990) e nas artérias umbilicais de fetos (Yarlagadda et al. 1989), foram demonstrados efeitos significativos da frequência cardíaca nos índices do *Doppler*.

No entanto, parece não existir diferenças significativas entre valores obtidos no testículo direito e esquerdo no mesmo animal e num estudo realizado em touros, os valores não variaram entre animais jovens e adultos, o que poderá indicar que a idade não afeta a perfusão testicular em animais saudáveis (De Souza et al. 2015; Gloria et al. 2018; Hedia et al. 2019).

Dentro dos parâmetros avaliados a sua fiabilidade parece também variar. Gloria et al. (2018), verificaram que os valores EDV e PSV ao nível do cordão espermático foram diferentes entre touros e no mesmo touro, sendo que os valores de RI foram repetíveis no mesmo touro. Estas diferenças podem dever-se ao facto dos parâmetros EDV e PSV serem dependentes do ângulo do *Doppler* utilizado ao contrário do RI. Esta limitação ecográfica faz com que seja necessário interpretar com cuidado os resultados obtidos (Pinggera et al. 2008).

As características anatómicas da artéria testicular nas suas diferentes regiões e as variações encontradas nos valores do EDV e PSV, permitem pressupor que a medição do RI ao nível da região marginal seja um parâmetro mais estável e fidedigno para avaliar o fluxo sanguíneo ao nível das gónadas masculinas (Gloria et al. 2018).

Vários estudos demonstraram que o fluxo sanguíneo fisiológico na artéria testicular apresenta um padrão monofásico e de baixa resistência vascular (Günzel-Apel et al. 2001; Zelli et al. 2013; De Souza, Da Cunha Barbosa et al. 2014; De Souza, Mota Filho et al. 2014). Este padrão é caracterizado por apresentar um fluxo sistólico lento, seguido de um decréscimo diastólico prolongado e uma velocidade, no fim da diástole, relativamente elevada (Zelli et al. 2013). No entanto, ao nível da região supratesticular proximal e média está descrito um padrão de resistência intermédia a alta com um pico sistólico acentuado (Trautwein et al. 2019).

Ao nível testicular a pressão capilar é extremamente baixa e notavelmente constante, mesmo com variações consideráveis ao nível da pressão sistémica. É sugerido que esta pressão seja controlada ao nível arterial e arteriolar, uma vez que a resistência pré-capilar apresenta valores elevados. A artéria testicular, ao nível do cordão espermático, parece ter um papel importante na manutenção desta resistência devido à sua anatomia longa e enrolada e ao seu reduzido diâmetro na sua porção proximal. Contudo, as características únicas desta microvascularização tornam os testículos suscetíveis a afeções vasculares (Sweeney et al. 1991).

Num estudo realizado em ratos, a isquemia testicular por um período de 100 minutos, induziu uma resposta ao nível dos túbulos seminíferos caracterizada pela destruição de células germinais em mitose ou no período de síntese de ácido desoxirribonucleico (ADN) da meiose, indicando que o efeito deletério de isquemia possa estar relacionado com a atividade de síntese de ADN nos ciclos de divisão de células em mitose e meiose (Tjioe and Steinberger

1970). Isto permite concluir que alterações vasculares têm implicações ao nível da espermatogénese.

A presença de varicoceles é um exemplo de uma afeção que leva a alterações na hemodinâmica testicular e, conseqüentemente, a problemas de fertilidade (Tsampoukas et al. 2019), sendo que vários mecanismos têm sido apresentados para justificar a sua influência na produção de espermatozoides (Rehman et al. 2019; Sweeney et al. 1991).

A avaliação do ejaculado, o volume testicular e ecografia modo-B têm sido apontadas como ferramentas para avaliar a função testicular, no entanto, apresentam algumas limitações. Uma vez que o ciclo espermático tem cerca de 62 dias, a realização de um espermograma vai refletir a função testicular com algum atraso, podendo afetar a capacidade de monitorização da progressão de diversas doenças testiculares. Segundo De Souza et al. (2015), o volume testicular por si só não é um parâmetro fiável para avaliar cães com história de infertilidade e a avaliação subjetiva da ecogenicidade e arquitetura das gónadas masculinas através da ecografia é difícil de relacionar com a função testicular, uma vez que observaram testículos aparentemente normais e outros com alterações da ecogenicidade tanto em cães férteis como inférteis.

Posto isto, o *Doppler* tem sido apontado como um bom indicador precoce de doenças testiculares relacionadas com alterações vasculares, permitindo o diagnóstico de disfunções testiculares numa fase inicial e, consecutivamente, possibilitar a aplicação dos tratamentos apropriados para maximizar a fertilidade e atrasar as alterações nos órgãos. Não sendo uma técnica invasiva, torna-se uma alternativa a processos invasivos como a realização de punção aspirativa de agulha fina (PAAF) e determinação da concentração de hormonas ao nível plasmático (Ortiz-Rodriguez et al. 2017). Para além disso, a avaliação da hemodinâmica testicular pode contribuir para a compreensão do mecanismo de termorregulação e fornecimento de oxigénio nos testículos de animais domésticos (Junior et al. 2018).

Atualmente, em medicina humana, estas técnicas são utilizadas para avaliar a capacidade reprodutiva de homens, devido à existência de vários estudos que apresentam resultados que corroboram a ideia de que a ecografia com recurso ao *Doppler* pode ser utilizada para avaliar de forma indireta a função das gónadas (Schurich et al. 2009).

Biagiotti et al. (2002) realizaram um trabalho no qual concluíram que o PSV e o RI podem ser utilizados como indicadores da espermatogénese, permitindo identificar homens inférteis e ainda diferenciar casos de azoospermia obstrutiva de não obstrutiva.

Em pacientes com azoospermia não obstrutiva, aquando da realização de uma PAAF, muitas vezes são apenas detetadas células de Sertoli. No entanto, a presença de vasos sanguíneos, principalmente em zonas periféricas, podem possivelmente indicar a presença de áreas residuais de espermatogénese, o que é importante aquando da realização de

técnicas como microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), evitando a realização de várias biópsias cegas e remoção excessiva de tecido (Foresta et al. 1998).

O índice de resistência (RI) tem sido um dos parâmetros mais utilizados. Os seus valores foram, por exemplo, correlacionados com a motilidade progressiva dos espermatozoides, o que demonstra que esta característica do ejaculado está relacionada com o fluxo sanguíneo testicular (Rehman et al. 2019). Os valores deste parâmetro foram também superiores em homens com oligoastenoespermia, o que mais uma vez sugere que este seja um indicador fiável da espermatogénese que pode ser usado por rotina pelos clínicos (Pinggera et al. 2008).

No panorama da medicina veterinária, a ecográfica testicular modo-B e o Doppler das artérias testiculares, devem fazer parte do exame andrológico e complementar a avaliação do potencial reprodutivo de cães machos (England and da Silva 2017). Um estudo, anteriormente realizado, sugere o RI e PI como potenciais marcadores da qualidade do ejaculado em cães (Zelli et al. 2013). Por outro lado, De Souza et al. (2015), encontraram diferenças subjetivas na ecogenicidade testicular e diferenças importantes no fluxo sanguíneo arterial, em várias regiões da artéria testicular, em cães inférteis.

Trabalhos nesta área têm sido realizados em várias espécies animais. Gloria et al. (2018), encontraram correlações significativas entre parâmetros do *Doppler* na artéria testicular e características do ejaculado em touros, concluindo que o RI na artéria marginal pode ser um parâmetro fácil para avaliar a qualidade da espermatogénese e, consequentemente, que a perfusão testicular se encontra correlacionada, pelo menos parcialmente, com uma função eficiente das gónadas masculinas. Em carneiros estão também documentadas correlações significativas entre os índices do *Doppler* Espectral (RI e PI) e valores obtidos na avaliação do ejaculado, como a concentração de espermatozoides e motilidade progressiva (Hedia et al. 2019). Em garanhões, Ortiz-Rodriguez et al. (2017) observaram que os animais férteis eram caracterizados por terem uma alta perfusão testicular, enquanto que os que apresentavam disfunção testicular tinham menores perfusões testiculares e índices do *Doppler* superiores e, portanto, maiores resistências vasculares.

Assim, o *Doppler* é, cada vez mais, visto como uma boa ferramenta para prever a qualidade do sémen e diagnosticar disfunções testiculares de forma não invasiva, em oposição aos métodos já utilizados (Ortiz-Rodriguez et al. 2017).

2.4 Raça Retriever do Labrador

Retriever do Labrador é uma raça relativamente recente, tendo sido criado o clube de raça em 1916. De estatura forte ao longo de todo o corpo e temperamento ativo e dócil, esta raça teve origem numa ilha de nome Terra Nova localizada na Península do Labrador no Canadá. Ótimos nadadores, com pelagem resistente e uma cauda larga, comparada com a

cauda de uma lontra, eram utilizados por pescadores para apanhar peixe e no auxílio das suas atividades diárias. Os machos apresentam, normalmente, uma altura ao garrote de 56 a 57cm, e as fêmeas de 54 a 56cm, podendo a sua pelagem ser preta, castanha ou variar entre vários tons de amarelo (FCI, 2011).

A raça é classificada pela federação cinológica internacional como pertencente ao Grupo 8 – *Retrievers, Flushing Dogs, Water Dogs*; Secção 1 *Retrievers*; Sujeito a prova de trabalho (FIC, 2011).

3.Relação entre o padrão de vascularização testicular e a qualidade do ejaculado em canídeos da raça retriever do Labrador.

3.1 Introdução e objectivos

A irrigação testicular apresenta um papel importante para o normal funcionamento das gónadas masculinas, não só por estar implicada no mecanismo de termorregulação testicular, mas também por ser responsável pelo transporte de nutrientes, oxigénio e hormonas essenciais para a realização das suas funções (Sweeney et al. 1991; Junior et al. 2018), como a produção de espermatozoides através de um processo designado por espermatogénese (Romano and Brinsko 2013).

No entanto, o facto da microvascularização testicular apresentar uma pressão capilar extremamente baixa e constante, torna as gónadas masculinas suscetíveis a alterações na sua hemodinâmica (Sweeney et al. 1991), pelo que, a presença de alterações vasculares pode comprometer a espermatogénese e conduzir, consequentemente, a problemas de fertilidade em cães (Tsampoukas et al. 2019).

Contudo, a deteção numa fase inicial de doenças que possam comprometer a produção de espermatozoides é desafiante. A título de exemplo, em situações de degenerescência idiopática, podem não estar presentes alterações significativas e verificar-se apenas uma diminuição gradual na qualidade do sémen (Ortiz-Rodriguez et al. 2017).

Torna-se, portanto, necessário estudar novas técnicas que permitam detetar numa fase precoce doenças testiculares relacionadas com alterações vasculares, permitindo o diagnóstico numa fase inicial e, consecutivamente, a aplicação dos tratamentos apropriados para maximizar a fertilidade e atrasar as alterações nos órgãos (Ortiz-Rodriguez et al. 2017).

A ecografia modo-B e Doppler são métodos complementares de diagnóstico não invasivos, economicamente eficazes e acessíveis, tecnicamente reprodutíveis e que raramente carecem de sedação dos animais. Tendo em conta as suas vantagens, devem fazer parte do exame andrológico e complementar a avaliação do potencial reprodutivo de cães machos (England and da Silva 2017).

A ecografia modo-B é rotineiramente utilizada na área de reprodução animal, mas a avaliação, de forma subjetiva, da ecogenicidade e ecotextura testiculares é difícil de relacionar

com a função das gónadas, uma vez que alterações nestes parâmetros são encontradas tanto em cães férteis como inférteis (De Souza et al. 2015).

O Doppler é uma ferramenta da ecografia que permite observar e estudar o fluxo sanguíneo nos diversos órgãos, permitindo avaliar condições fisiológicas e patológicas (Dziêcio et al. 2014; Matton and Nyland 2015a). Esta ferramenta tem sido, cada vez mais, apontada como uma boa alternativa para prever a qualidade do sémen e diagnosticar disfunções testiculares relacionadas com alterações vasculares numa fase precoce (Ortiz-Rodriguez et al. 2017).

O facto de a artéria testicular ser a única fonte de irrigação dos testículos permite, através da utilização do *Doppler*, estudar e caracterizar de forma fiável o fluxo sanguíneo ao nível testicular (Gloria et al. 2018) e, possivelmente, detetar padrões de vascularização anómalos que poderão fornecer informações úteis para a distinção de lesões inflamatórias, degenerativas e neoplásicas (Bigliardi et al. 2019).

O objetivo principal deste estudo foi estudar as características do fluxo sanguíneo ao nível da artéria testicular e aferir a sua relação com a qualidade do ejaculado em cães da raça Retriever do Labrador. Através do *Doppler*, avaliou-se o padrão de vascularização ao nível do parênquima testicular e foram registados os parâmetros velocidade no pico da sístole (PSV), velocidade no fim da diástole (EDV), índice de resistência (RI) e índice de pulsatilidade (PI) da artéria testicular ao nível do cordão espermático e da sua região marginal. Posteriormente, com o intuito de avaliar a existência ou ausência de correlações estatisticamente significativas, estes parâmetros foram comparados com a concentração e número total de espermatozoides, motilidade, vitalidade, morfologia dos espermatozoides e resultados do teste hiposmótico nas amostras de ejaculado obtidas dos mesmos cães.

Para além deste objetivo, pretendeu-se ainda iniciar um processo de padronização dos parâmetros PSV, EDV, RI e PI em diversas regiões da artéria testicular (região supratesticular proximal, média e distal; e região marginal) para a raça Retriever do Labrador.

3.2 Materiais e métodos

Este projeto foi realizado no serviço de Reprodução de Animais de Companhia do Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa entre os meses de fevereiro e setembro de 2020.

O protocolo utilizado neste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para a Investigação e Ensino da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

3.2.1 População em estudo

Neste trabalho foram utilizados dez cães da raça Retriever do Labrador (n=10), do “Canil da Quinta das Tílias”. Para cada cão foram recolhidas informações respeitantes à idade, peso, historial clínico ou cirúrgico relevante, fármacos administrados nos seis meses anteriores à avaliação, data da última colheita de sémen ou cruzamento e tipo de alimentação.

Nenhum dos animais utilizados apresentava historial clínico ou cirúrgico relevante, com exceção de um dos cães que tinha historial de dermatite escrotal. A nenhum dos animais foi administrada qualquer tipo de medicação nos seis meses anteriores. Em termos de alimentação, sete dos cães eram alimentados com carne de frango crua e ração seca, enquanto três eram alimentados apenas com ração seca. O intervalo de tempo decorrido desde o(a) último(a) cruzamento/colheita de ejaculado até ao dia da colheita para o presente estudo foi de oito meses em um cão, seis meses em um cão, cinco meses em um cão, quatro meses em dois cães, dois meses em um cão, um mês em três cães e um dos cães nunca tinha cruzado.

3.2.2 Observação e palpação testicular

Antes da realização da ecografia testicular, todos os cães foram sujeitos a uma observação e palpação do escroto, testículos, epidídimo e cordão espermático de modo a averiguar as suas características e a eventual presença de lesões e/ou corpos estranhos.

Considerou-se como normal as seguintes características em relação aos testículos: localização escrotal, móveis, simétricos, com orientação dorsocaudal, consistência firme, sem sinais de aderências ao escroto ou presença de lesões nodulares e indolores à palpação (Cunha 2008; England and da Silva 2017).

Sinais de inflamação e/ou infeção e de trauma foram também investigados ao nível do escroto, epidídimo, cordão espermático e pénis. Todas as alterações encontradas foram documentadas e posteriormente registadas.

3.2.3 Ecografia testicular e prostática

Os exames ecográficos foram realizados por um único operador. Os animais foram examinados sem sedação, em decúbito lateral contrário ao testículo avaliado, após a realização de tricotomia do escroto e da região abdominal caudal. Foi ainda utilizado gel condutor de modo a aumentar o contacto entre a sonda ecográfica e o corpo do animal.

O Esaote MyLabTMX7 foi o equipamento ecográfico utilizado, tendo-se optado pela utilização de uma sonda linear com frequência entre os 4 MHz e os 15 MHz para a avaliação dos testículos e do cordão espermático. Para a avaliação da próstata, optou-se pela utilização de uma sonda microconvexa e frequências entre 3 e 11 MHz.

3.2.4 Modo-B

Ambos os testículos foram examinados ecograficamente em dois planos, um longitudinal e outro transversal e o seu volume foi calculado através da fórmula: comprimento x largura x altura x 0.52 (Trautwein et al. 2019).

Através do modo-B avaliou-se, de forma subjetiva, a ecogenicidade e a ecotextura testicular. A ecogenicidade foi classificada em normal ou alterada e a ecotextura como homogênea ou heterogênea. A presença ou ausência de microlitíase foi ainda documentada.

Relativamente à próstata, avaliou-se a ecogenicidade e ecotextura e calculou-se, automaticamente, o seu volume através da fórmula: comprimento x largura x altura x 0.524 (Mattoon and Nyland 2015b). Posteriormente, a fórmula: $V = (0.867 \times BW) + (1.885 \times A) + 15.88$ (em que BW representa o peso corporal e A a idade) foi utilizada para aferir se os volumes prostáticos eram inferiores ao volume máximo considerado normal tendo em conta as idades e os pesos vivos dos animais (Ruel et al. 1998).

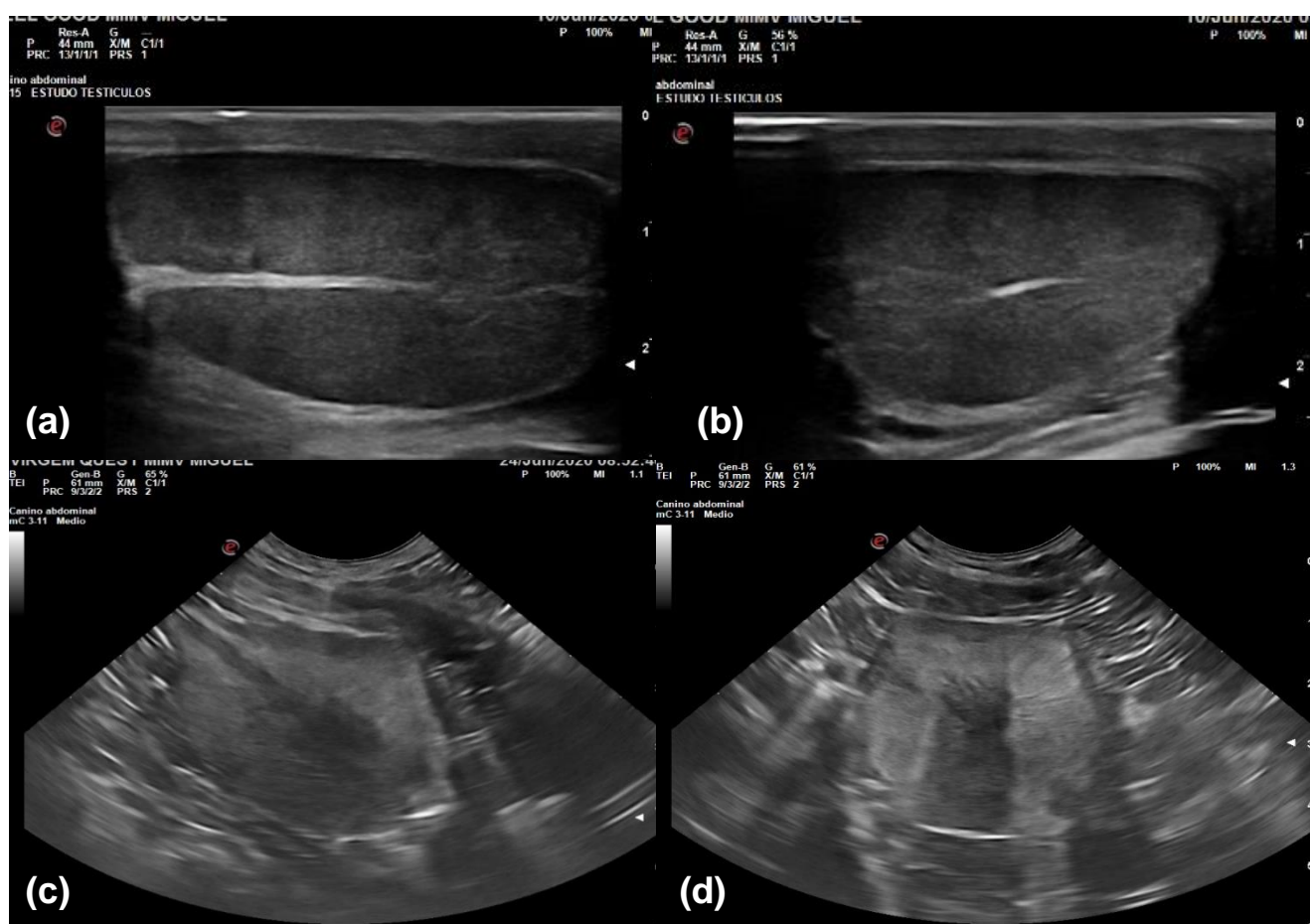


Figura 2 Ecografia Modo-B testicular e prostática. Em (a) plano longitudinal testicular obtido com uma sonda linear (4-15 MHz); em (b) plano transversal longitudinal obtido com uma sonda linear (4-15 MHz). Em (c) e (d) próstata num plano longitudinal e transversal, respetivamente, obtidos com uma sonda microconvexa (3-11 MHz).

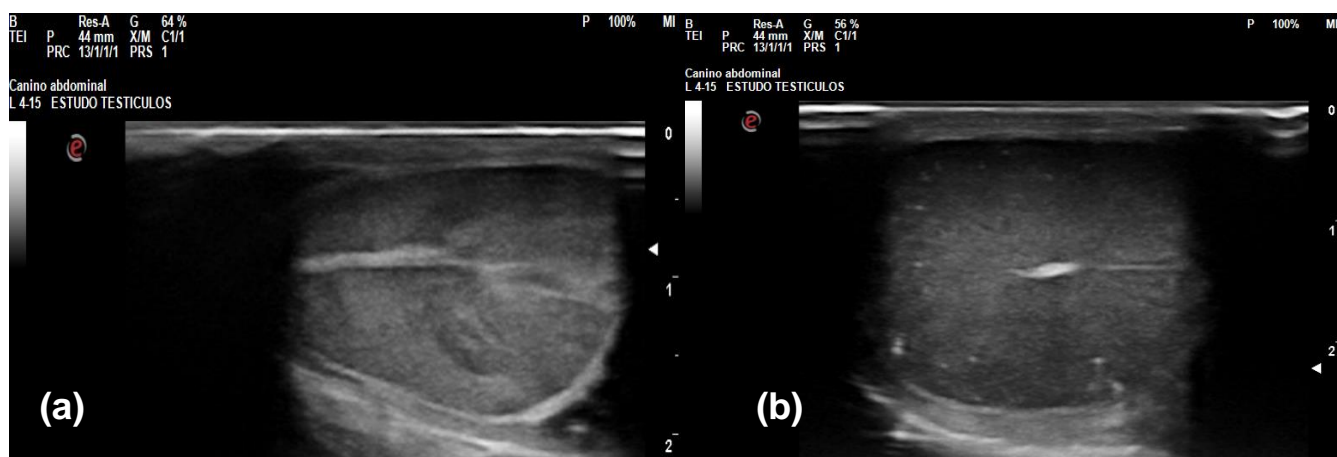


Figura 3 Alterações testiculares observadas à ecografia Modo-B. (a) Imagem de testículo com ecotextura heterogênea, num plano longitudinal, obtida com uma sonda linear (4-15 MHz); (b) Imagem de testículo com focos de microlitíase, num plano transversal, obtida com uma sonda ecográfica linear (4-15 MHz).

3.2.5 Doppler Cor e Doppler Pulsado

De modo a realizar o exame ultrassonográfico com recurso ao *Doppler*, foi estabelecida uma frequência de repetição de pulso de 1,5 KHz para o *Doppler* Cor e 2,5 KHz para o *Doppler* pulsado, sendo que neste último, ao nível da região supratesticular proximal, o ângulo do Doppler utilizado foi de 60°.

Através da utilização do *Doppler* Cor identificou-se a artéria testicular ao nível do cordão espermático e da sua região marginal. Após a sua identificação, e utilizando o *Doppler* Pulsado obtiveram-se os seguintes parâmetros: Velocidade no pico da sístole (PSV); Velocidade no fim da diástole (EDV); Índice de resistência (RI) e Índice de pulsatilidade (PI). O RI e o PI foram calculados através das fórmulas $[RI = (PSV - EDV) / PSV]$ e $[PI = (PSV - EDV) / \text{velocidade média}]$, respetivamente (Matton and Nyland 2015a). As medições dos parâmetros acima referidos foram executadas, em ambos os testículos, em três regiões distintas da artéria testicular, subjetivamente demarcadas do sentido da aorta para o testículo em supratesticular proximal, média e distal e na sua localização marginal. Em cada localização, foram feitas duas medições de pelo menos quatro ciclos cardíacos e posteriormente realizou-se o cálculo da sua média.

Para além disso, as ondas de fluxo sanguíneo, observadas nas diferentes regiões das artérias, foram classificadas como apresentando um padrão monofásico (baixa resistência vascular) ou bifásico (resistência intermédia a alta).

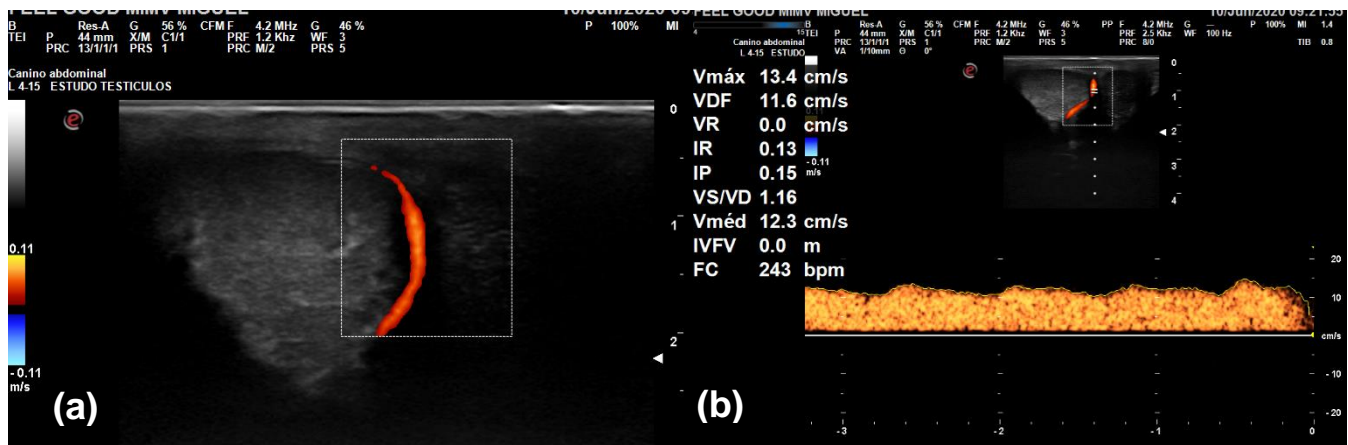


Figura 4 Utilização do *Doppler* ao nível da artéria testicular na sua região marginal. *Doppler* Cor (a) e *Doppler* Pulsado (b) da artéria testicular na sua região marginal.

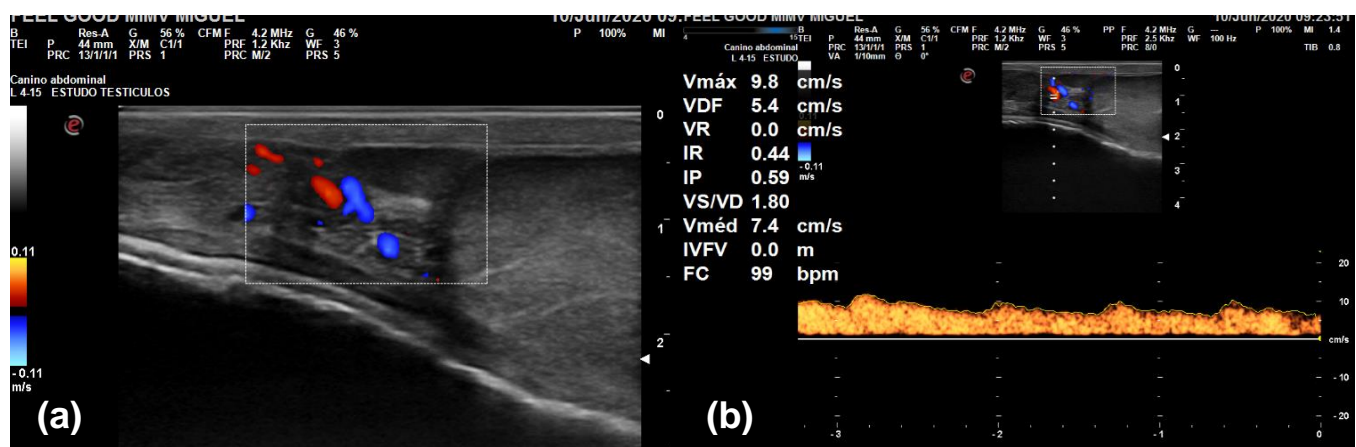


Figura 5 Utilização do *Doppler* ao nível da artéria testicular na sua região suprastesticular distal. *Doppler* Cor (a) e *Doppler* Pulsado (b) da artéria testicular na sua região suprastesticular distal.

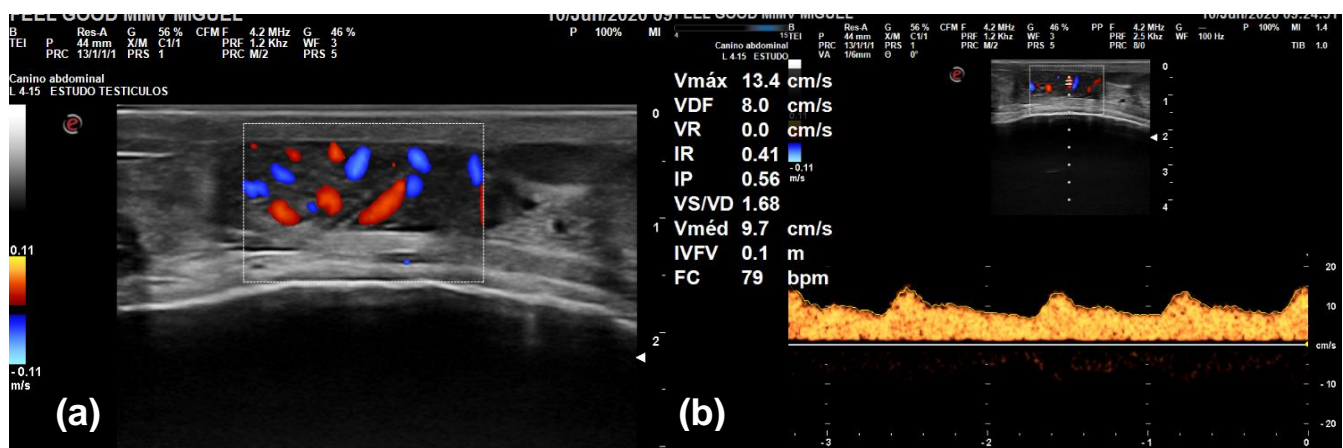


Figura 6 Utilização do *Doppler* ao nível da artéria testicular na sua região suprastesticular média. *Doppler* Cor (a) e *Doppler* Pulsado (b) da artéria testicular na sua região suprastesticular média.

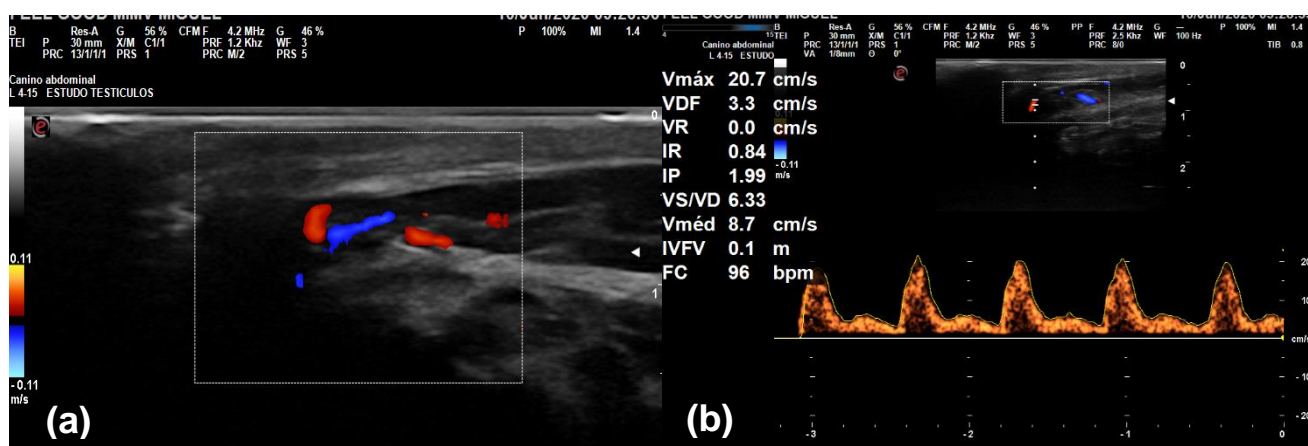


Figura 7 Utilização do Doppler ao nível da artéria testicular na sua região suprastesticular proximal. Doppler Cor (a) e Doppler Pulsado (b) da artéria testicular na sua região suprastesticular proximal.

3.2.6 Power Doppler intratesticular

Ao nível intratesticular utilizou-se o *Power Doppler* de modo a obter um padrão de vascularização testicular. Foi selecionado um plano longitudinal central envolvendo a região do *mediastino testis* e utilizado um PRF de 1,2 KHz.

Posteriormente, utilizando o programa Fiji: ImageJ, foram analisadas diversas imagens com a mesma ampliação, de ambos os testículos dos cães presentes neste estudo. A percentagem da área de vascularização testicular identificada por ecografia foi calculada após a obtenção do número de pixels presentes na área total testicular e, através de um limiar de cores, do número de pixels das zonas vasculares identificadas com o *Power Doppler*.

Para fins estatísticos, foram utilizados os valores das médias obtidas das várias imagens de cada animal.

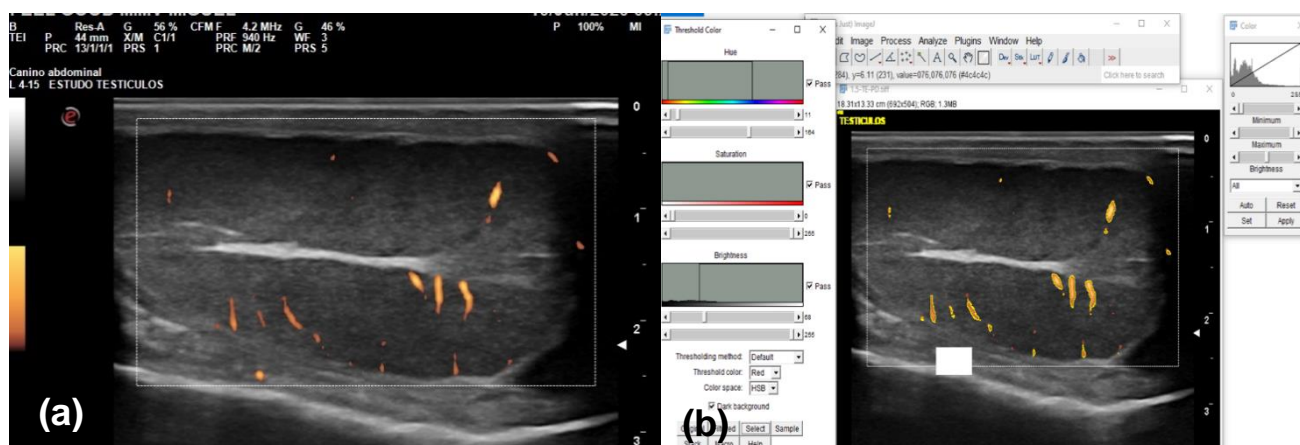


Figura 8 Padrão de vascularização intratesticular. (a) Utilização do *Power Doppler* para obtenção do padrão de vascularização testicular. (b) Utilização do programa Fiji: Image J para a obtenção do número de pixels da área vascularizada através de um limiar de cor, para posterior cálculo da percentagem da área vascularizada.

3.2.7 Espermograma

A recolha de ejaculado foi realizada pelo criador na sala de consultas e através da técnica de estimulação manual do pénis, com compressões rítmicas sobre os bulbos da

glande (England and da Silva 2017; McGowan 2019). Foi utilizada uma fêmea em estro em 8 dos 10 cães.

Tabela 3 Material utilizado para a colheita e avaliação dos ejaculados.

Cone vaginal de latex	Microscópio binocular (Olympus CH30, Japão)
Tubos de plástico graduados	Câmara de Neubauer (Albert Sass, Alemanha)
Lâminas e lamelas	Corante Eosina-Negrosina (Maim SL, Espanha)
Pipetas	Solução de formol-citrato 1%
Placa de aquecimento	Solução de frutose 60mOsm/L
Estufa (Termaks, Noruega)	Medidor de pH (Radiometer PHM220, França)
Banho-maria (JP Selecta, Espanha)	Diff-Quik (Maim SL, Espanha)

Volume

Após a colheita da segunda fração de ejaculado para um tubo de plástico graduado, o seu volume foi anotado de modo a ser utilizado posteriormente no cálculo do número total de espermatozoides.

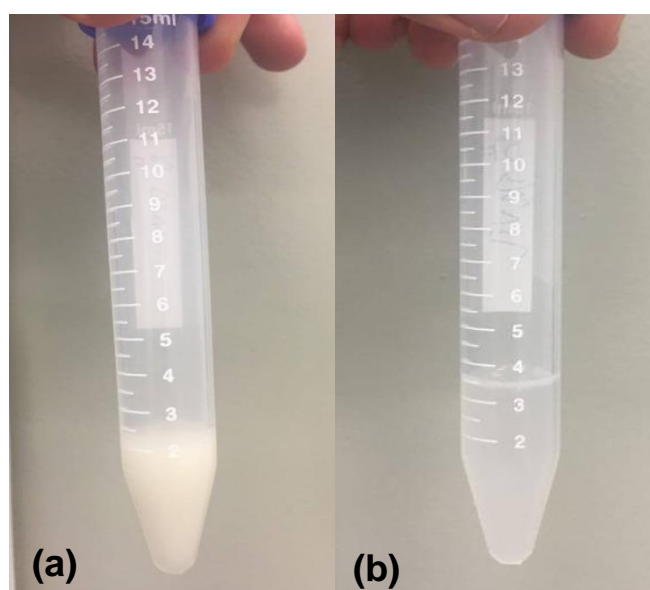


Figura 9 Colheita das diferentes frações de um ejaculado para tubos graduados. (a) Segunda fração com o aspeto leitoso característico; (b) Terceira fração do ejaculado.

Motilidade

Para a avaliação da motilidade dos espermatozoides, uma gota da segunda fração de ejaculado foi colocada entre lamina e lamela e posteriormente observada ao microscópio com as objetivas de 10 ou 40 vezes, condensador baixo e luz diminuída (McGowan 2019). O material utilizado encontrava-se a uma temperatura entre os 30°C e os 35°C (Threlfall 2003; England and da Silva 2017).

Os diferentes movimentos (retilíneo e progressivo; pendular; circular; retrogrado; e imóvel) realizados pelos espermatozoides foram anotados e discriminados em percentagem. Para fins estatísticos, utilizou-se a percentagem de espermatozoides com movimentos retilíneos e progressivos rápidos, tendo-se considerado como normais percentagens iguais ou superiores a 70% (England e da Silva, 2017). Para cada ejaculado, foram realizadas duas contagens, tendo-se utilizado o valor da média posteriormente calculado.

Concentração e número total de espermatozoides no ejaculado

O cálculo da concentração de espermatozoides nas amostras analisadas neste estudo foi realizado através da utilização de uma câmara de Neubauer. Procedeu-se à diluição da segunda fração com uma solução de formol-citrato a 1%. Na maioria dos casos realizou-se uma diluição de 1:100, no entanto, nos casos onde a concentração esperada era inferior, optou-se por uma diluição de 1:50. Depois do preenchimento do hemocitómetro e de um compasso de espera para permitir a deposição das células no fundo do mesmo, realizou-se a contagem de 4 quadrados laterais da câmara (Figura 10). Em cada amostra foram efetuadas duas contagens, e a média multiplicada pelo volume da segunda fração de modo a calcular o número total de espermatozoides no ejaculado. Considerou-se como normais amostras com pelo menos 300×10^6 espermatozoides (England and da Silva 2017).

Cálculo da concentração:

$$[\text{spz}]/\text{mL} = n / 4 \times 10^2 \times 10^4$$

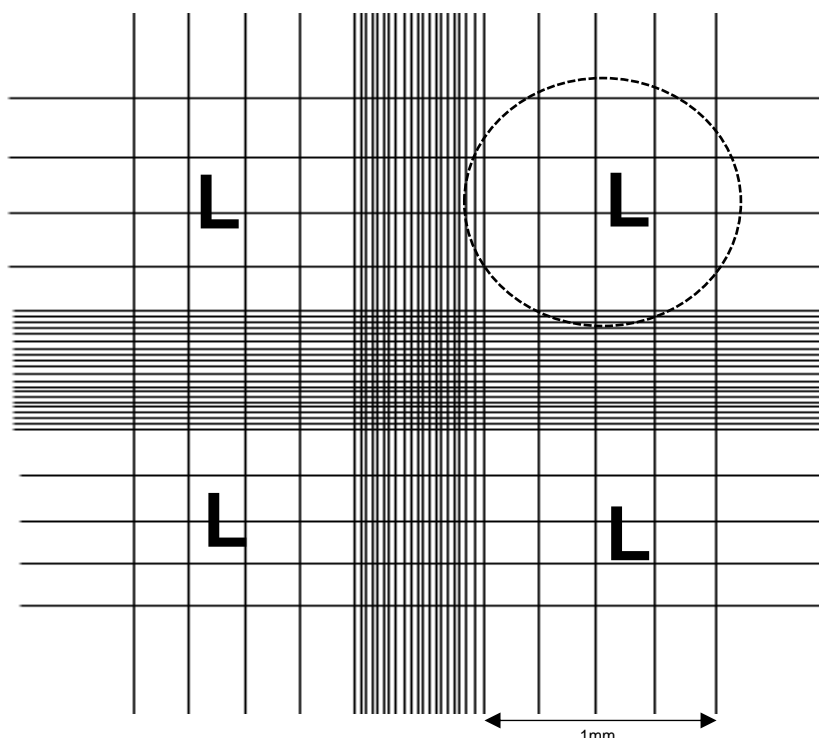
n-Número total de células espermáticas contabilizadas nos quatro quadrados;

4- Número de quadrados da câmara de Neubauer utilizados para a contagem;

10^2 - Correção do fator de diluição (1:100); quando a diluição foi 1:50 multiplicou-se por 50.

10^4 - De modo a apresentar a concentração por mL.

Figura 10 Esquema representativo da câmara de Neubauer.



Na contagem de espermatozoides na câmara de Neubauer devem utilizar-se os quadrados grandes, marcados com a letra L.

Vitalidade e Morfologia

A vitalidade e morfologia foram parâmetros analisados ao microscópio com uma ampliação de 400x (objetiva de 40), em esfregaços corados com o corante supra-vital eosina-nigrosina (Swanson and Bearden 1951). Para ambos os parâmetros, foram observadas entre cem e duzentas células em cada lâmina, tendo sido realizadas duas avaliações em dois esfregaços distintos de cada amostra e posterior cálculo da média.

Em relação à vitalidade os espermatozoides não corados foram considerados como vivos e os corados como mortos e relativamente à morfologia as alterações foram identificadas individualmente e classificadas como pertencentes à cabeça, peça intermédia ou cauda (H. Koziol and L. Armstrong 2018). Os defeitos morfológicos individuais não foram analisados estatisticamente, uma vez que o reduzido número de algumas categorias poderia não permitir uma análise estatisticamente significativa (Seed et al. 1996). Para a avaliação da morfologia foram estudados apenas espermatozoides considerados vivos. Os resultados foram apresentados em percentagem. Para ser considerado como normal, o ejaculado teve de apresentar pelo menos 80% de espermatozoides morfolologicamente normais (D. Johnston et al. 2001).

Teste hiposmótico

De modo a aferir a integridade da membrana dos espermatozoides, diluiu-se 0,1mL de sémen em 1mL de uma solução de frutose com uma osmolaridade de 60 mOsm/L. As amostras foram incubadas em banho maria a 37°C durante trinta minutos. Posteriormente, uma gota foi colocada entre uma lâmina e lamela e observada ao microscópio com uma ampliação de 400x. Para cada amostra de ejaculado foram avaliadas duas preparações e, em cada lâmina, procedeu-se à observação de cem a duzentos espermatozoides, tendo sido calculada a média das percentagens de espermatozoides com a cauda enrolada e esticada a partir dos resultados obtidos em ambas as preparações (Kumi-Diaka 1993). Por fim, de modo a obter um resultado mais fidedigno, subtraiu-se à percentagem média de espermatozoides com caudas enroladas no teste hiposmótico a percentagem de células espermáticas com enrolamento das caudas aquando da avaliação morfológica.

Neste teste, foi considerado o limite de 70% de espermatozoides com caudas enroladas para se considerar a amostra como normal (Cunha 2008; England and da Silva 2017).

pH

Nos animais em que foi possível recolher a terceira fração do ejaculado, procedeu-se à medição do pH desta fração. No cão o pH normal do plasma seminal varia entre 6.3 e 7 (Robert et al. 2016). No fluido prostático o pH pode variar entre 6.0 e 7,4, com uma média de 6.8 (Feldman and Nelson 2004).

Bacteriologia

De modo a despistar crescimento bacteriano ou a presença de infeções subclínicas, foi enviada uma amostra da segunda fração do ejaculado para o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa e requerida uma pesquisa de bactérias aeróbias.

O sémen de um cão saudável deve apresentar menos de dez mil unidades formadoras de colónias (UFC) por mililitro de ejaculado (Robert et al. 2016).

De igual modo, e sem prévia centrifugação das amostras, foram efetuados esfregaços com coloração *Diff-Quik* (Maim SL), para aferir a presença de neutrófilos degenerados e/ou bactérias fagocitadas, sendo estes indicadores de infeção subclínica (Solano-Gallego and Masserdotti 2016).

3.2.8 Análise estatística

Os dados recolhidos foram inseridos numa base de dados no programa Microsoft® Office 16 Excel e analisados com recurso ao programa R (versão 4.0.2) com a extensão R Commander (versão 2.6.2) e ao programa SPSS®. Através do teste Shapiro-Wilks foi testada a normalidade dados para cada variável, sendo que para as variáveis com distribuição normal foram apresentados os valores das médias e desvios-padrão e para as restantes variáveis os valores das medianas e intervalos interquartil (IIQ).

De modo a averiguar a existência de correlações estatisticamente significativas entre os parâmetros avaliados no espermograma (concentração, nº total de espermatozoides, % caudas enroladas no teste hiposmótico, % de espermatozoides com movimentos retilíneos e progressivos, % de espermatozoides morfológicamente normais e % de espermatozoides vivos) e os parâmetros obtidos com recurso ao *Doppler* Pulsado (PSV, EDV, PI e RI) nas diversas regiões da artéria testicular (marginal, supratesticular distal, média e proximal) recorreu-se ao coeficiente de correlação de Spearman. O coeficiente de correlação de Spearman foi ainda utilizado para averiguar a existência de correlações entre os parâmetros avaliados nos ejaculados e os volumes testiculares e entre as percentagens das áreas vascularizadas e os parâmetros obtidos através do espermograma e do *Doppler* Pulsado.

Para verificar a existência de diferenças entre os volumes testiculares, percentagens das áreas vascularizadas dos parênquimas e os parâmetros do *Doppler* Pulsado nas diversas regiões da artéria testicular nas gónadas contralaterais efetuou-se o teste Paired-samples Wilcoxon.

O teste Two-sample Wilcoxon foi utilizado para averiguar a existência de diferenças significativas entre os valores das médias da artéria testicular esquerda e direita, dos parâmetros obtidos com o *Doppler* Pulsado, entre os quatro cães com infeções subclínicas e os restantes.

A presença de diferenças significativas, dos parâmetros do *Doppler* entre as diversas regiões, foi averiguada através do teste de Friedman com teste de pares de Dunn e correção de Bonferroni.

Por fim, o teste de Mann-Whitney foi utilizado para aferir diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros do espermograma consoante a ecogenicidade, ecotextura e presença ou ausência de calcificações.

Todos os testes efetuados apresentam um intervalo de confiança de 95%, tendo-se considerado um nível de significância de p inferior a 0,05.

3.3 Resultados

3.3.1 Caracterização da população

Um total de dez cães foi incluído neste estudo (n=10). As idades dos cães variaram entre 18 e 101 meses ($44,1 \pm 24,48$), e os pesos entre 32,8 Kg e 39,3 Kg ($37,36 \pm 1,92$).

Nenhum dos cães apresentou lesões ao nível do pénis, escroto ou testículos dignas de registo. Em relação à consistência testicular, seis cães apresentaram uma consistência fibroelástica normal (60%), três apresentaram uma consistência diminuída em ambas as gónadas (30%) e um apresentou uma menor consistência apenas no testículo direito (10%).

3.3.2 Ecografia Modo-B

Os resultados obtidos da avaliação testicular relativamente à sua ecogenicidade, ecotextura e presença ou ausência de microlitíase estão presentes na tabela 4.

Tabela 4 Resultados obtidos da avaliação testicular com recurso à ecografia modo-B.

CÃO	ECOGENICIDADE		ECOTEXTURA		MICROLITÍASE	
	TE	TD	TE	TD	TE	TD
1	N	N	He	Ho	-	-
2	N	N	Ho	Ho	-	-
3	A	A	He	He	-	-
4	N	N	He	Ho	+	-
5	N	N	Ho	Ho	+	+
6	N	N	Ho	Ho	-	-
7	N	N	Ho	Ho	-	-
8	N	N	He	He	+	+
9	N	N	He	He	-	-
10	N	N	Ho	Ho	-	-

TE: Testículo esquerdo; **TD:** Testículo direito; **N:** Normal; **A:** Alterada; **Ho:** Homogénea; **He:** Heterogénea; **(+):** Presente; **(-):** Ausente.

Em relação aos testículos esquerdos, os volumes variaram entre $6,0 \text{ cm}^3$ e $17,3 \text{ cm}^3$, apresentando uma média de $12,29 (\pm 3,04) \text{ cm}^3$, e os testículos direitos entre $4,6 \text{ cm}^3$ e $15,5 \text{ cm}^3$, com uma média de $11,87 (\pm 3,02) \text{ cm}^3$. Não foram encontradas diferenças significativas entre os volumes dos testículos contralaterais ($p = 0.4922$; Paired-samples Wilcoxon).

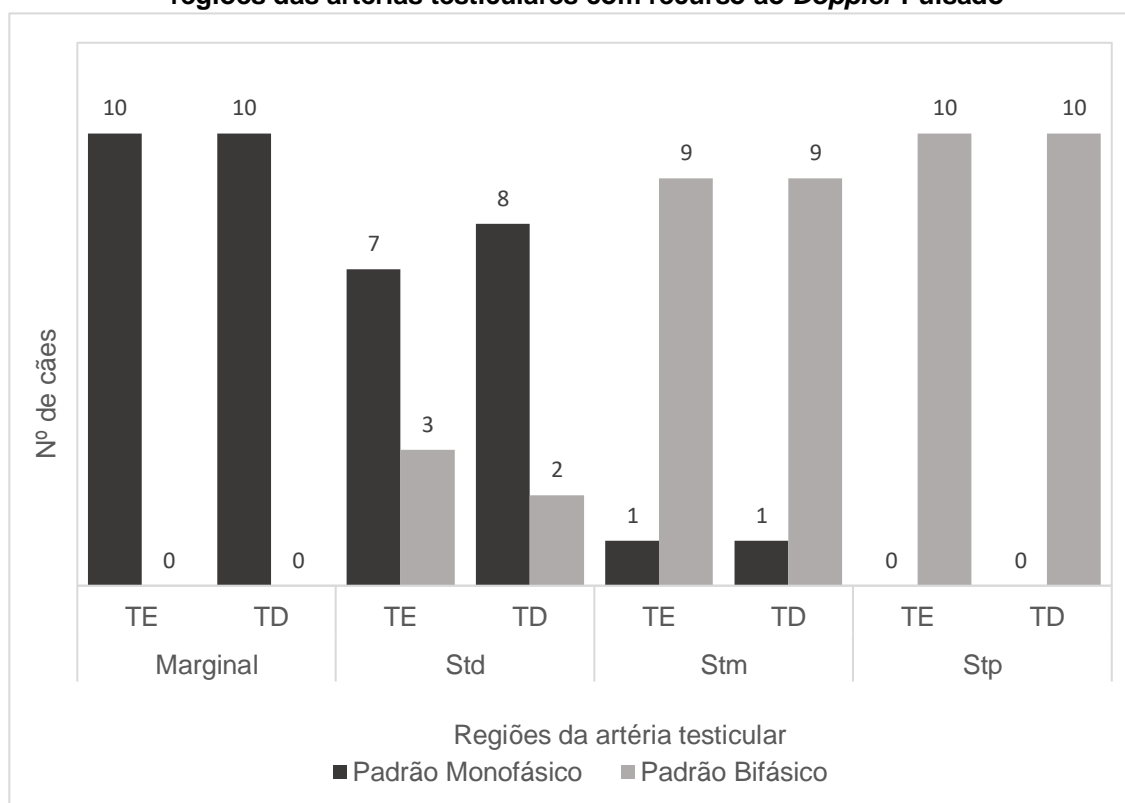
Os volumes prostáticos variaram entre $16,9 \text{ cm}^3$ e $106,4 \text{ cm}^3$ (mediana 25,20 e IIQ 21,98-37,28) e apenas um dos cães apresentou um volume prostático superior ao máximo considerado normal tendo em conta a sua idade e peso. No entanto, todas as próstatas avaliadas apresentaram uma forma oval e bilobada, com parênquima homogéneo, textura média a fina, ecogenicidade normal, margens suaves e bem definidas e ausência de lesões focais.

3.3.3 Ecografia com recurso ao *Doppler* Cor e *Doppler* Pulsado

Através do *Doppler* Cor a artéria testicular foi identificada em todas as regiões pretendidas (marginal, supratesticular distal, supratesticular média e supratesticular proximal).

No gráfico 1 estão representados o número de cães nos quais foram observados padrões monofásicos e bifásicos das ondas dos fluxos sanguíneos nas várias regiões das artérias testiculares esquerdas e direitas, sendo que, apenas na região marginal, todos os cães apresentaram um padrão de onda monofásico e, na região supratesticular proximal, um padrão de onda bifásico.

Gráfico 1 Padrões das ondas dos fluxos sanguíneos observados nas várias regiões das artérias testiculares com recurso ao *Doppler* Pulsado



TE: Testículo esquerdo; **TD:** Testículo direito; **Std:** Supratesticular distal; **Stm:** Supratesticular média; **Stp:** Supratesticular proximal.

Na tabela 5 encontram-se os resultados dos parâmetros do *Doppler* Pulsado, avaliados (PSV, EDV, PI e RI) nas diferentes regiões da artéria testicular ao nível do testículo esquerdo e direito de cada animal.

Tabela 5 Medianas e IIQ dos parâmetros do *Doppler* Pulsado obtidos nas várias regiões da artéria testicular ao nível do testículo esquerdo e direito.

Parâmetro	Testículo	St proximal	St média	St distal	Marginal
PSV (cm/s)	Direito (n=10)	38,05 (25,73- 44,31)	15,30 (13,54- 16,85)	12,78 (11,48- 14,65)	15,13 (11,34- 16,70)
	Esquerdo (n=10)	43,13 (25,43- 49,28)	17,93 (15,55- 22,49)	12,88 (12,19- 15,23)	13,33 (10,43- 15,90)
EDV (cm/s)	Direito (n=10)	5,45 (5,18- 11,23)	4,33 (3,54- 7,61)	7,33 (6,49- 9,13)	9,43 (8,74- 10,40)
	Esquerdo (n=10)	5,98 (3,60- 8,86)	5,63 (3,84- 7,80)	7,60 (6,64- 8,06)	10,05 (7,08- 11,33)
PI	Direito (n=10)	2,28 (1,80- 2,52)	1,33 (0,79- 1,70)	0,63 (0,28- 0,94)	0,37 (0,24- 0,54)
	Esquerdo (n=10)	2,25 (2,04- 2,50)	1,35 (1,13- 1,67)	0,62 (0,46- 0,86)	0,36 (0,31- 0,44)
RI	Direito (n=10)	0,84 (0,74- 0,88)	0,72 (0,46- 0,76)	0,45 (0,21- 0,59)	0,31 (0,22- 0,40)
	Esquerdo (n=10)	0,87 (0,79- 0,90)	0,71 (0,63- 0,78)	0,43 (0,34- 0,54)	0,30 (0,24- 0,36)

PSV: Velocidade no pico da sístole; **EDV:** Velocidade no fim da diástole; **PI:** Índice de pulsatilidade; **RI:** Índice de resistência; **Marginal:** Região marginal; **St distal:** Região suprastesticular distal; **St média:** Região suprastesticular média; **St proximal:** Região suprastesticular proximal da artéria testicular.

O teste Paired-samples Wilcoxon demonstrou não existirem diferenças significativas entre a artéria testicular esquerda e direita no que respeita aos vários parâmetros do *Doppler* Pulsado avaliados nas diversas regiões.

No entanto, foi possível observar que os parâmetros PSV, EDV, PI e RI demonstraram diferenças significativas entre as regiões estudadas. Os resultados obtidos estão discriminados na tabela 6, sendo notável uma diminuição progressiva do PSV, RI e PI à medida que a artéria se aproxima do parênquima testicular.

Tabela 6 Medianas e IIQ dos parâmetros avaliados através do Doppler Pulsado nas diversas regiões da artéria testicular.

Parâmetro	St proximal (n=20)	St média (n=20)	St distal (n=20)	Marginal (n=20)
PSV (cm/s)	41,85 (24,89- 46,31) ^a	16,58 (14,15- 19,53) ^b	12,88 (11,93- 14,93) ^c	13,60 (10,76- 16,50) ^{b,c}
EDV (cm/s)	5,45 (4,69- 10,04) ^a	5,15 (3,71- 8,04) ^a	7,50 (6,46- 8,29) ^{a,b}	9,80 (7,91- 10,78) ^b
PI	2,25 (1,86- 2,52) ^a	1,33 (1,01- 1,71) ^a	0,62 (0,37- 0,91) ^b	0,37 (0,27- 0,46) ^b
RI	0,85 (0,76- 0,89) ^a	0,72 (0,58- 0,77) ^a	0,43 (0,28- 0,58) ^b	0,31 (0,23- 0,37) ^b

Dentro de cada grupo, células com letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$), resultados obtidos através do teste de Friedman com teste de pares de Dunn e correção de Bonferroni. **PSV**: Velocidade no pico da sístole; **EDV**: Velocidade no fim da diástole; **PI**: Índice de pulsatilidade; **RI**: Índice de resistência; **Marginal**: Região marginal; **St distal**: Região suprastesticular distal; **St média**: Região suprastesticular média; **St proximal**: Região suprastesticular proximal da artéria testicular.

De referir ainda que não foram encontradas diferenças significativas entre os parâmetros obtidos através do *Doppler Pulsado* nos quatro cães com infeções subclínicas e os restantes animais, pelo que todos foram incluídos num só grupo de animais clinicamente saudáveis sem problemas de fertilidade (mencionado no próximo subcapítulo).

3.3.4 Resultados do espermograma

Os resultados obtidos da avaliação dos ejaculados estão descritos nas tabelas 7 e 8. Na tabela 7, são apresentadas as médias e desvios-padrão das variáveis que demonstraram uma distribuição normal. Na tabela 8 estão descritas as medianas e IIQ das variáveis que não apresentaram uma distribuição normal. Em ambos os casos estão presentes os valores mínimos e máximos de cada parâmetro.

Tabela 7 Parâmetros avaliados nos ejaculados com distribuição normal.

Parâmetro	Média ± desvio-padrão	Mínimo-Máximo
Volume 2ª fração (mL)	2,88 ± 1,24	1 - 5
Spz/mL (x10⁶)	435,45 ± 292,1	123,5 - 1090,25
Nº total Spz (x10⁶)	1157,87 ± 738,35	245,65 – 2725,63
% Spz vivos	90,07 ± 3,88	81,5 – 94,5
pH 3ª fração	6,21 ± 0,19	6,01 – 6,5

Spz/mL: concentração de espermatozoides por mililitro de ejaculado; **Nº total Spz**: Número total de espermatozoides na amostra de ejaculado colhida; **%Spz vivos**: percentagem de espermatozoides vivos.

Tabela 8 Parâmetros avaliados nos ejaculados sem distribuição normal.

Parâmetro	Mediana e IIQ	Mínimo – Máximo
% Spz com MRP	78,98 (66,83 – 84,75)	26,4 – 93,5
% Spz com caudas enroladas no teste hiposmótico	88,48 (86,83 – 90,53)	20,29 - 93
% Spz morfolologicamente normais	91,5 (88,75 – 94,85)	43,03 – 96,5

% Spz com MRP: Percentagem de espermatozoides com movimento retilíneos e progressivos; % Spz com caudas enroladas no teste hiposmótico: percentagem de espermatozoides com caudas enroladas no teste hiposmótico; % Spz morfolologicamente normais: percentagem de espermatozoides que apresentaram uma morfologia normal.

Relativamente às culturas bacteriológicas, ocorreu um crescimento superior a 10^3 unidades formadoras de colónias por mililitro de ejaculado em quatro dos dez cães (40%). Num dos cães foi isolado apenas a espécie *Streptococcus canis*, sendo que nos restantes três cães isolou-se *Pasteurella multocida*. No entanto, num destes três últimos animais para além da *Pasteurella*, foi ainda isolado *Staphylococcus pseudintermedius*. De referir, que nestes quatro animais foram observados neutrófilos degenerados e bactérias fagocitadas nas citologias efetuadas. Nos restantes seis cães não foram encontradas alterações citológicas dignas de registo.

3.3.5 Correlação entre espermograma e ecografia modo-B

Os parâmetros do espermograma avaliados (concentração, nº total de espermatozoides, % caudas enroladas no teste hiposmótico, % de espermatozoides com movimentos retilíneos e progressivos, % de espermatozoides morfolologicamente normais e % de espermatozoides vivos) foram correlacionados com o volume testicular médio, ecogenicidade testicular, ecotextura testicular e presença ou ausência de microlitíase nos testículos.

Não foram observadas correlações significativas (correlação de Spearman) entre os resultados de qualidade do ejaculado e o volume testicular (tabela 9).

Tabela 9 Resultados do coeficiente de correlação de Spearman entre o volume testicular médio e os parâmetros do espermograma avaliados.

Variável em estudo	Correlação de Spearman	p
Concentração (Spz/mL)	0,3089	0,3852
Nº total de Spz	0,4015	0,2501
% Spz com caudas enroladas no teste hiposmótico	-0,4195	0,2275
%Spz com Mrp	-0,3696	0,2932
% Spz Normais	-0,4826	0,1577
% Spz Vivos	-0,1904	0,5983

Spz/mL: concentração de espermatozoides por mililitro de ejaculado; **Nº total Spz:** Número total de espermatozoides na amostra de ejaculado colhida; **% Spz com caudas enroladas no teste hiposmótico:** percentagem de espermatozoides com caudas enroladas no teste hiposmótico; **% Spz com MRP:** Percentagem de espermatozoides com movimento retilíneos e progressivos; **% Spz normais:** percentagem de espermatozoides que apresentaram uma morfologia normal. **%Spz vivos:** percentagem de espermatozoides vivos.

De modo a aferir diferenças significativas nos parâmetros do espermograma consoante a ecogenicidade, ecotextura e presença ou ausência de microlitíase foi realizado um teste de Mann-Whitney. Os resultados permitem afirmar que apenas a percentagem de espermatozoides vivos exibiu uma diferença significativa ($p=0,028$) entre os cães que apresentaram uma ecotextura do testículo esquerdo homogénea e heterogénea, sendo a percentagem de espermatozoides vivos mais elevada nos casos em que a ecotextura testicular era homogénea.

3.3.6 Correlação entre espermograma e valores do *Doppler Pulsado*

Os resultados dos coeficientes de correlação de Spearman entre os parâmetros avaliados no espermograma e os parâmetros obtidos utilizando o *Doppler Pulsado* (PSV, EDV, PI e RI) nas regiões marginais, supratesticulares distais, médias e proximais estão apresentados nas tabelas 10, 11, 12 e 13, respetivamente. Com base nos valores obtidos é possível constatar que existem algumas correlações positivas significativas entre:

1. % espermatozoides morfologicamente normais e RI na região marginal ($p=0,0217$);
2. Concentração de espermatozoides por mL e PI na região supratesticular distal ($p=0,0392$);
3. Concentração de espermatozoides por mL e PSV na região supratesticular média ($p=0,0018$);
4. Nº total de espermatozoides e PSV na região supratesticular média ($p=0,0015$);
5. % caudas enroladas no teste hiposmótico e PSV na região supratesticular média ($p=0,0195$);

6. % espermatozoides morfolologicamente normais e EDV na região supratesticular média ($p=0,0251$);
7. Concentração de espermatozoides por mL e PSV na região supratesticular proximal ($p=0,0251$);
8. % caudas enroladas no teste hiposmótico e PSV na região supratesticular proximal ($p=0,0186$).

Tabela 10 Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman e valores de p entre os parâmetros avaliados no ejaculado e os parâmetros obtidos através do Doppler Pulsado na artéria testicular ao nível da sua região marginal.

MARGINAL	PSV	EDV	PI	RI
Concentração (Spz/mL)	0,4303 ($p=0,2145$)	0,1030 ($p=0,7770$)	0,3576 ($p=0,3104$)	0,3939 ($p=0,2600$)
Nº total de Spz	0,4303 ($p=0,2145$)	0,1515 ($p=0,6761$)	0,3697 ($p=0,2931$)	0,4667 ($p=0,1739$)
%Spz com caudas enroladas no teste hiposmótico	0,4424 ($p=0,2004$)	0,2121 ($p=0,5563$)	0,1758 ($p=0,6272$)	0,2242 ($p=0,5334$)
% Spz com Mrp	0,3818 ($p=0,2763$)	0,0788 ($p=0,8287$)	0,3576 ($p=0,3104$)	0,4303 ($p=0,2145$)
% Spz normais	0,5273 ($p=0,1173$)	0,0909 ($p=0,8028$)	0,6121 ($p=0,0600$)	0,7091 ($p=0,0217$)
% Spz vivos	0,3212 ($p=0,3655$)	0,3333 ($p=0,3466$)	0,1758 ($p=0,6272$)	0,2121 ($p=0,5563$)

Spz/mL: concentração de espermatozoides por mililitro de ejaculado; **Nº total Spz:** Número total de espermatozoides na amostra de ejaculado colhida; **% Spz com caudas enroladas no teste hiposmótico:** percentagem de espermatozoides com caudas enroladas no teste hiposmótico; **% Spz com MRP:** Percentagem de espermatozoides com movimento retilíneos e progressivos; **% Spz normais:** percentagem de espermatozoides que apresentaram uma morfologia normal. **%Spz vivos:** percentagem de espermatozoides vivos. **PSV:** Velocidade no pico da sístole; **EDV:** Velocidade no fim da diástole; **PI:** Índice de pulsatilidade; **RI:** Índice de resistência.

Tabela 11 Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman e valores de p entre os parâmetros avaliados no ejaculado e os parâmetros obtidos através do Doppler Pulsado na artéria testicular ao nível da sua região supratesticular distal.

STD	PSV	EDV	PI	RI
Concentração (Spz/mL)	0,4134 (p=0,2351)	-0,3091 (p=0,3848)	0,6565 (p=0,0392)	0,3161 (p=0,3736)
Nº total de Spz	0,3040 (p=0,3932)	0,1152 (p=0,7514)	0,4620 (p=0,1789)	0,1459 (p=0,6876)
% Spz com caudas enroladas no teste hiposmótico	0,2614 (p=0,4657)	-0,3212 (p=0,3655)	0,4802 (p=0,1601)	0,2857 (p=0,4236)
% Spz com MRP	0,1763 (p=0,6261)	-0,2121 (p=0,5563)	0,4559 (p=0,1854)	0,3222 (p=0,3639)
% Spz normais	0,3465 (p=0,3267)	0,0545 (p=0,8810)	0,2492 (p=0,4874)	0,1641 (p=0,6505)
% Spz vivos	0,1216 (p=0,7379)	0,0788 (p=0,8287)	0,2979 (p=0,4032)	-0,0973 (p=0,7892)

Spz/mL: concentração de espermatozoides por mililitro de ejaculado; **Nº total Spz:** Número total de espermatozoides na amostra de ejaculado colhida; **% Spz com caudas enroladas no teste hiposmótico:** percentagem de espermatozoides com caudas enroladas no teste hiposmótico; **% Spz com MRP:** Percentagem de espermatozoides com movimento retilíneos e progressivos; **% Spz normais:** percentagem de espermatozoides que apresentaram uma morfologia normal. **%Spz vivos:** percentagem de espermatozoides vivos. **PSV:** Velocidade no pico da sístole; **EDV:** Velocidade no fim da diástole; **PI:** Índice de pulsatilidade; **RI:** Índice de resistência; **STD:** Supratesticular distal.

Tabela 12 Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman e valores de p entre os parâmetros avaliados no ejaculado e os parâmetros obtidos através do Doppler Pulsado na artéria testicular ao nível da sua região supratesticular média.

STM	PSV	EDV	PI	RI
Concentração (Spz/mL)	0,8511 (p=0,0018)	0,4182 (p=0,2291)	0,1394 (p=0,7009)	0,0909 (p=0,8028)
Nº total de Spz	0,8571 (p=0,0015)	0,5758 (p=0,0816)	-0,0061 (p=0,9867)	-0,1394 (p=0,7009)
% Spz com caudas enroladas no teste hiposmótico	0,7173 (p=0,0195)	0,4545 (p=0,1869)	-0,1030 (p=0,7770)	-0,0667 (p=0,8548)
% Spz com MRP	0,4985 (p=0,1425)	0,1879 (p=0,6032)	0,2485 (p=0,4888)	0,2000 (p=0,5796)
% Spz normais	0,6261 (p=0,0528)	0,6970 (p=0,0251)	-0,3455 (p=0,3282)	-0,3818 (p=0,2763)
% Spz vivos	0,4134 (p=0,2351)	0,2727 (p=0,4458)	-0,0909 (p=0,8028)	-0,1515 (p=0,6761)

Spz/mL: concentração de espermatozoides por mililitro de ejaculado; **Nº total Spz:** Número total de espermatozoides na amostra de ejaculado colhida; **% Spz com caudas enroladas no teste hiposmótico:** percentagem de espermatozoides com caudas enroladas no teste hiposmótico; **% Spz com MRP:** Percentagem de espermatozoides com movimento retilíneos e progressivos; **% Spz normais:** percentagem de espermatozoides que apresentaram uma morfologia normal. **%Spz vivos:** percentagem de espermatozoides vivos. **PSV:** Velocidade no pico da sístole; **EDV:** Velocidade no fim da diástole; **PI:** Índice de pulsatilidade; **RI:** Índice de resistência; **STM:** Suprtesticular média.

Tabela 13 Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman e valores de p entre os parâmetros avaliados no ejaculado e os parâmetros obtidos através do Doppler Pulsado na artéria testicular ao nível da sua região supratesticular proximal.

STP	PSV	EDV	PI	RI
Concentração (Spz/mL)	0,6970 (p=0,0251)	0,1879 (p=0,6032)	0,2485 (p=0,4888)	0,2067 (p=0,5667)
Nº total de Spz	0,4061 (p=0,2443)	0,0061 (p=0,9867)	0,2606 (p=0,4671)	0,2918 (p=0,4133)
% Spz com caudas enroladas no teste hiposmótico	0,7212 (p=0,0186)	0,4909 (p=0,1497)	-0,1030 (p=0,7770)	-0,1277 (p=0,7253)
%Spz com MRP	0,3333 (p=0,3466)	0,3576 (p=0,3104)	-0,0061 (p=0,9867)	-0,0669 (p=0,8544)
% Spz normais	0,6242 (p=0,0537)	0,5758 (p=0,0816)	-0,2364 (p=0,5109)	-0,2067 (p=0,5667)
% Spz vivos	0,2000 (p=0,5796)	-0,0182 (p=0,9602)	0,2970 (p=0,4047)	0,3100 (p=0,3833)

Spz/mL: concentração de espermatozoides por mililitro de ejaculado; **Nº total Spz:** Número total de espermatozoides na amostra de ejaculado colhida; **% Spz com caudas enroladas no teste hiposmótico:** percentagem de espermatozoides com caudas enroladas no teste hiposmótico; **% Spz com MRP:** Percentagem de espermatozoides com movimento retilíneos e progressivos; **% Spz normais:** percentagem de espermatozoides que apresentaram uma morfologia normal. **%Spz vivos:** percentagem de espermatozoides vivos. **PSV:** Velocidade no pico da sístole; **EDV:** Velocidade no fim da diástole; **PI:** Índice de pulsatilidade; **RI:** Índice de resistência; **STP:** Suprtesticular proximal.

3.3.7 Padrão de vascularização intratesticular

A percentagem de área vascularizada do parênquima dos testículos esquerdos variou de 0,53% e 3,08% (1.59 ± 0.86) e a dos testículos direitos entre 0,83% e 2,92% ($1,71 \pm 0,79$), não sendo diferente entre gónadas contralaterais ($p=0,8384$, teste Wilcoxon).

No anexo 1 estão apresentados os resultados do coeficiente de correlação de Spearman entre a percentagem de área vascularizada média de ambos os testículos e os parâmetros avaliados no espermograma, não se tendo observado correlações significativas.

Os resultados do coeficiente da correlação de Spearman entre a percentagem de área vascularizada média de ambos os testículos e os valores das médias dos parâmetros obtidos com recurso ao *Doppler* Pulsado nas artérias testiculares esquerda e direita estão discriminados no anexo 2. Tendo em conta os valores obtidos é possível verificar que não existem correlações significativas.

3.4 Discussão

O *Doppler* é, cada vez mais, considerado uma ferramenta útil no diagnóstico precoce de disfunções testiculares relacionadas com alterações vasculares (Ortiz-Rodriguez et al. 2017).

Salienta-se que o objetivo principal deste trabalho foi estudar as características do fluxo sanguíneo ao nível da artéria testicular e aferir a sua relação com a qualidade do ejaculado. De forma a minimizar a influência da raça, tamanho e manejo dos animais foram utilizados apenas cães da raça Retriever do Labrador e de um só canil. Este facto, permite ainda iniciar um processo de padronização dos parâmetros estudados para a raça, sendo este o segundo objetivo do ensaio. A conhecimento dos autores, é a primeira vez que um estudo deste tipo é realizado apenas em cães da raça Retriever do Labrador.

3.4.1 Avaliação ecográfica

No presente trabalho, foi possível, através da ecografia modo-B, avaliar a ecogenicidade, ecotextura, presença ou ausência de microlitíase e o volume dos testículos. Os volumes testiculares não apresentaram diferenças significativas ($p=0,4922$) entre gónadas contralaterais. Apesar de existirem estudos nos quais estão descritas diferenças significativas (De Souza, Da Cunha Barbosa et al. 2014; De Souza et al. 2015), os resultados obtidos vão de encontro ao descrito por Trautwein et al. (2019), e uma vez que foram utilizados apenas cães saudáveis sem história de problemas de fertilidade e sem qualquer afeção testicular diagnosticada, não seria expectável encontrar assimetrias testiculares significativas.

Através do *Doppler* Cor, identificou-se a artéria testicular na região supratesticular e marginal. Esta artéria é caracterizada por ter um trajeto tortuoso ao nível supratesticular, tendo sido detetados fluxos multidirecionais em diferentes segmentos do mesmo vaso e um percurso mais linear ao longo da curvatura testicular ao nível da região marginal. Esta anatomia da artéria testicular, ao nível do cordão espermático, contribui para o mecanismo de termorregulação testicular, permitindo uma maior aposição entre as artérias e veias e consequentemente maiores trocas de calor. De salientar ainda que a extensão do comprimento desta artéria resulta na eliminação quase completa do pulso arterial, condição essencial para uma normal espermatogénese (J. Parkinson 2019).

Relativamente aos padrões das ondas sonoras, obtidos através do *Doppler* Pulsado, ao nível da região média e proximal 90% e 100% dos animais apresentaram, respetivamente, padrões bifásicos com resistências que variaram de intermédias a altas, sendo que ao nível das regiões supratesticular distal e marginal foi detetado um padrão monofásico de baixa resistência. Este facto, é justificável por a artéria testicular ter origem direta na aorta, vaso com fluxo sanguíneo de elevada resistência e que, posteriormente, à medida que se aproxima dos testículos vai gradualmente apresentando uma menor resistência ao fluxo sanguíneo,

devido ao seu extenso comprimento, tortuosidade e redução da espessura do endotélio vascular (Trautwein et al. 2019). Próximo aos testículos é consistente a presença de padrões monofásicos de baixa resistência, uma vez que estes são órgãos parenquimatosos que necessitam de um suprimento sanguíneo constante (Carvalho et al. 2008).

Os resultados obtidos foram diferentes dos apresentados por Günzel-Apel et al. (2001), Zelli et al. (2013), De Souza e Da Cunha Barbosa et al. (2014) e De Souza e Mota Filho et al. (2014), que descrevem o fluxo sanguíneo ao longo da artéria testicular dos cães, como apresentando apenas um padrão monofásico e baixa resistência vascular. Contudo, nenhum dos estudos citados subdividiu a região supratesticular nas regiões distal, média e proximal, como efetuado no nosso trabalho. Por outro lado, vão de encontro aos reportados por Trautwein et al. (2019), que subdividiram de igual forma esta região.

Os valores dos parâmetros do fluxo sanguíneo, obtidos através do *Doppler Espectral*, não foram diferentes entre testículos contralaterais do mesmo animal, permitindo assim validar a utilização dos valores das médias obtidas de ambas as gônadas para posteriores correlações, tal como observado em outros trabalhos (De Souza et al. 2015; Gloria et al. 2018; Hedia et al. 2019).

No entanto, relativamente às regiões da artéria testicular todos os parâmetros avaliados apresentaram diferenças significativas entre as regiões analisadas, demonstrando concordância com o descrito por Carrillo et al. (2012), De Souza e Da Cunha Barbosa et al. (2014), De Souza e Mota Filho et al. (2014), Ortiz-Rodriguez et al. (2017) e Trautwein et al. (2019).

Relativamente ao PSV e aos índices PI e RI, foi notória uma diminuição desde a região supratesticular proximal até à região marginal. Por outro lado, foram observadas velocidades no final da diástole (EDV) mais altas ao nível marginal não tendo, no entanto, diferido relativamente à região supratesticular distal. Posto isto, a diminuição progressiva na velocidade do fluxo sanguíneo ao longo da artéria testicular, assim como da resistência e pulsatilidade à medida que esta se aproxima do parênquima, deve-se provavelmente à anatomia da artéria, a qual apresenta, ao longo do seu percurso, uma diminuição da espessura da parede vascular e um aumento do diâmetro interno (De Souza, Mota Filho, et al. 2014). Não obstante, a diminuição dos índices à medida que a artéria se aproxima do parênquima, corrobora mais uma vez a necessidade de uma perfusão sanguínea contínua das gônadas masculinas através de um fluxo de baixa velocidade e de uma velocidade diastólica constante, evitando o comprometimento da sua função (Carvalho et al. 2008; Trautwein et al. 2019). O aumento do EDV ao longo da artéria está associado com a diminuição do PSV, que ocorre devido à diminuição da resistência vascular à medida que esta se aproxima do parênquima testicular, sendo consistente com os padrões monofásicos observados na região marginal, caracterizados por apresentarem um fluxo sistólico lento,

seguido de um decréscimo diastólico prolongado e uma velocidade, no fim da diástole, relativamente elevada (Zelli et al. 2013).

De referir que, apesar de todas as medições terem sido feitas pelo mesmo operador, minimizando possíveis diferenças interoperador, outros fatores podem influenciar os parâmetros avaliados. Para além de alterações na frequência cardíaca, devido ao stress dos animais (H. Mostbeck et al. 1990; Yarlagadda et al. 1989), as diferentes regiões da artéria testicular não se encontram bem delimitadas, pelo que, medições análogas realizadas com poucos centímetros de diferença podem levar à obtenção de valores dispares (Trautwein et al. 2019).

3.4.2 Espermograma

A avaliação de amostras de ejaculado, constitui um dos principais componentes aquando da realização de um exame andrológico completo. Este exame pode ser efetuado para avaliar a capacidade reprodutiva dos animais, em situações de compra e venda de reprodutores, programas de inseminação artificial e conservação de sémen. Não obstante, apresenta também utilidade no diagnóstico de afeções reprodutivas e posteriormente na monitorização da sua resolução (Cunha 2008; England and da Silva 2017).

Apesar de três cães, presentes neste estudo, exibirem algumas alterações relevantes no que diz respeito à percentagem de espermatozoides com movimentos retilíneos progressivos, percentagem de espermatozoides com caudas enroladas no teste hiposmótico e percentagem de espermatozoides com morfologia normal, as médias do grupo encontraram-se dentro dos valores espectáveis.

No entanto, os dois cães com alterações mais relevantes fazem parte dos quatro animais que apresentaram culturas bacterianas com mais de 10^3 UFC/mL de ejaculado, limite máximo considerado normal (Robert et al. 2016), e citologias com neutrófilos degenerados e bactérias fagocitadas. Estas alterações podem, portanto, ser resultado de infeções subclínicas, uma vez que a presença de neutrófilos e bactérias parece afetar negativamente a função dos espermatozoides (Zeyad et al. 2017; Khodamoradi et al. 2020).

Contudo, todos os cães apresentavam-se clinicamente saudáveis no momento da recolha, sendo utilizados como reprodutores e não tendo qualquer história de problemas de fertilidade. Desta forma, as alterações individuais poderão dever-se também ao intervalo de tempo decorrido desde a colheita anterior até à efetuada para este estudo e ao stress associado ao facto de o local de colheita ter sido diferente daquele a que os animais se encontram habituados. De referir ainda que, uma amostra de má qualidade num cão nervoso, pode não ser representativa (Freshman 2002). De forma a comprovar estas suposições, teria sido útil proceder à repetição das colheitas e, conseqüentemente, avaliar novamente os ejaculados dos respetivos cães.

3.4.3 Relação entre a ecografia modo-B e a qualidade do ejaculado

No presente trabalho não foram constatadas correlações significativas entre os parâmetros avaliados no espermograma e os volumes testiculares e, nenhum destes apresentou diferenças significativas consoante a ecogenicidade, ecotextura e presença ou ausência de microlitíase testicular, com exceção da percentagem de espermatozoides vivos, que evidenciou ser estatisticamente superior em cães com uma ecotextura do testículo esquerdo homogênea comparativamente aos que apresentaram uma ecotextura heterogênea.

Estes resultados demonstram que o volume testicular, por si só, não é um parâmetro fiável para avaliar a função testicular e que a avaliação subjetiva da ecogenicidade e arquitetura das gónadas masculinas através da ecografia é difícil de relacionar com a função testicular. De Souza et al. (2015), descreveram testículos aparentemente normais e outros com alterações da ecogenicidade tanto em cães férteis como inférteis. Curiosamente, neste ensaio, o cão que apresentou uma pior qualidade seminal tinha testículos com ecogenicidades normais e desprovido de microlitíases à avaliação ecográfica.

Relativamente à microlitíase testicular, apesar de ser um achado ecográfico e neste estudo não ter apresentado correlações negativas com a qualidade dos ejaculados, é relevante referir que os animais nos quais foram observadas deverão ser seguidos, uma vez que num futuro poderão apresentar problemas de fertilidade ou mesmo tumores testiculares. Apesar de ser um assunto controverso, no homem a presença de microlitíase correlaciona-se negativamente com os parâmetros avaliados no ejaculado (Xu et al. 2014), e a sua presença pode estar associada a um aumento da incidência de tumores testiculares (Wang et al. 2015). Em relação aos tumores, ainda não é compreendido o papel da presença de microlitíase testicular, não sendo possível aferir se se trata de uma causa ou de um fator de risco (Wang et al. 2015). Por outro lado, o efeito sobre a qualidade seminal parece dever-se à obstrução dos túbulos seminíferos com conseqüente inflamação secundária, aumento da pressão dentro dos túbulos e alteração da irrigação sanguínea ao nível das gónadas masculinas (Xu et al. 2014).

3.4.4 Relação entre os parâmetros do *Doppler Pulsado* e a qualidade do ejaculado

Devido à existência de estudos que corroboram com a ideia de que a ecografia com recurso ao *Doppler* pode ser utilizada para avaliar de forma indireta a função das gónadas (Schurich et al. 2009), estas técnicas são cada vez mais utilizadas em medicina humana. Biagiotti et al. (2002), concluem, inclusive, que o PSV e o RI podem ser utilizados como indicadores de espermatogénese, permitindo identificar homens inférteis e ainda, diferenciar casos de azoospermia obstrutiva de não obstrutiva.

No panorama da medicina veterinária, England e da Silva (2017) sugerem que a ecografia testicular modo-B e o *Doppler* das artérias testiculares devem fazer parte do exame andrológico e complementar a avaliação do potencial reprodutivo de cães machos, existindo ainda trabalhos publicados que apresentam correlações significativas entre os parâmetros do *Doppler* Pulsado e a qualidade seminal (Zelli et al. 2013; De Souza et al. 2015; Ortiz-Rodriguez et al. 2017; Gloria et al. 2018; Hedia et al. 2019).

No presente ensaio, apesar da maior parte das variáveis em estudo não terem demonstrado correlações significativas, algumas foram constatadas e podem ser discutidas. É necessário reforçar a ideia que foi utilizada uma amostra homogênea de cães reprodutores, saudáveis no momento da realização do estudo.

Ao nível das regiões supratesticular média e proximal a velocidade no pico da sístole (PSV) correlacionou-se positivamente com a concentração, número total de espermatozoides (apenas na região média) e percentagem de caudas enroladas no teste hiposmótico que, por sua vez, é um método para aferir a integridade membranar. Permitindo concluir que, possivelmente, velocidades de fluxo sanguíneo superiores estejam correlacionadas com uma melhor qualidade seminal. Estes resultados eram expectáveis, uma vez que o facto da pressão capilar ao nível testicular ser extremamente baixa e constante torna as gónadas masculinas suscetíveis a afeções vasculares e qualquer insulto que conduza a isquémia poderá ter implicações ao nível da espermatogénese (Sweeney et al. 1991). No entanto, é necessário ter alguma contenção aquando da interpretação dos resultados, pelo facto do PSV, ao contrário do RI e PI, ser um parâmetro dependente do ângulo do *Doppler* (Brandão et al. 2018).

No que respeita às regiões supratesticulares média e marginal, apenas foram detetadas correlações positivas significativas entre o PI e a concentração de espermatozoides e o RI e a percentagem de espermatozoides morfolologicamente normais, respetivamente. Contando que, o RI e PI se encontram inversamente relacionados com a perfusão sanguínea, e em razão disso, se especular que quanto menores estes índices maior será a eficiência da espermatogénese, de um ponto de vista quantitativo (Hedia et al. 2019), os resultados observados no presente trabalho, nestas regiões, são controversos. Curiosamente, o RI e a região marginal têm sido apontados, respetivamente, como o parâmetro e região que permitem obter valores mais fidedignos para avaliar o fluxo sanguíneo ao nível das gónadas masculinas (Günzel-Apel et al. 2001; Gloria et al. 2018). Todavia, tal não foi observado nos nossos resultados.

É relevante referir que algumas medições realizadas por os autores previamente referenciados, foram efetuadas ao nível intratesticular ao contrário do sucedido neste estudo. Não obstante, o reduzido número da amostra (n=10) influencia, inevitavelmente, os resultados

obtidos, podendo ser uma justificação para as diferenças relativas a trabalhos anteriormente publicados.

Contudo, os resultados constatados neste ensaio, permitem concluir que a perfusão testicular se encontra relacionada com a função das gónadas masculinas e que em testículos sem alterações presentes, velocidades de fluxo superiores estão associadas a melhores qualidades seminais.

3.4.5 Padrão de vascularização intratesticular

Por último, aquando da avaliação do padrão de vascularização intratesticular, as percentagens da área vascularizada dos parênquimas não diferiram entre as gónadas contralaterais e não foi descoberta nenhuma correlação significativa com os parâmetros estudados no espermograma e obtidos através do *Doppler Pulsado*. A dificuldade técnica de adquirir diversas imagens num plano idêntico em cada testículo, poderá ser uma justificação para tal, visto ter sido observado uma grande variabilidade entre valores obtidos no mesmo testículo. De referir ainda, que não foram detetados nódulos ou alterações degenerativas nem qualquer sinal de inflamação. Assim sendo, não foi possível retirar conclusões no que diz respeito ao papel do padrão de vascularização intratesticular na avaliação da qualidade de ejaculados de cães saudáveis sem história de problemas de fertilidade.

3.5 Conclusão

A ecografia é um método complementar de diagnóstico útil aquando da realização de um exame andrológico. O desenvolvimento do *Doppler* veio possibilitar o estudo e caracterização do fluxo sanguíneo ao nível da artéria testicular, única fonte de irrigação das gónadas masculinas, contribuindo para uma maior compreensão do mecanismo de termorregulação, diagnóstico precoce de alterações vasculares e, possivelmente, prever a qualidade do ejaculado.

Os resultados constatados neste ensaio, permitem concluir que o volume testicular, por si só, não é um parâmetro fiável para avaliar a função testicular e que a avaliação subjetiva da ecogenicidade e arquitetura das gónadas masculinas através da ecografia é difícil de relacionar com a sua função. Para além disso, conclui-se também que a perfusão testicular se encontra relacionada com a função testicular e que existirá, provavelmente, uma relação entre os parâmetros obtidos através do *Doppler* Pulsado e as características dos ejaculados em cães, sendo que velocidades de fluxo sanguíneo superiores parecem estar associados a melhores qualidades seminais. Sendo órgãos parenquimatosos que necessitam de um suprimento sanguíneo constante, é coerente observar uma diminuição da velocidade do fluxo sanguíneo e da resistência ao longo do percurso da artéria testicular.

Não obstante, a realização de novos estudos nesta área permanece indispensável. O facto de terem sido seleccionados apenas cães usados regularmente como reprodutores, sem historia de problemas de fertilidade, impedindo a comparação com um grupo de animais com disfunções testiculares presentes, o reduzido número de cães utilizados ($n=10$), a execução de uma única colheita de ejaculado por cão, tornando a sua representatividade discutível, e a privação de uma delimitação precisa das diferentes regiões da artéria testicular são algumas das fragilidades que podem ser apontadas neste trabalho. A aplicabilidade destes parâmetros deve ser, portanto, certificada em cães com funções testiculares comprometidas, executando vários espermogramas por animal e após uma uniformização das delimitações de cada região da artéria testicular.

4.Referências bibliográficas

Biagiotti G, Cavallini G, Modenini F, Vitali G, Gianaroli L. 2002. Spermatogenesis and spectral echo-colour Doppler traces from the main testicular artery. *BJU Int.* 90(9):903–908. doi:10.1046/j.1464-410X.2002.03033.x.

Bigliardi E, Denti L, De Cesaris V, Bertocchi M, Di Ianni F, Parmigiani E, Bresciani C, Cantoni AM. 2019. Colour Doppler ultrasound imaging of blood flows variations in neoplastic and non-neoplastic testicular lesions in dogs. *Reprod Domest Anim.* 54(1):63–71. doi:10.1111/rda.13310.

Brandão P, Soares E, Estevinho C, Freixo M, Sofia A, Carvalho P, Ferreira MJ. 2018. A review of Medical Doppler US. *J Med Ultrasound.*(July):115–117. doi:10.4103/JMU.JMU.

Carrillo JD, Soler M, Lucas X, Agut A. 2012. Colour and Pulsed Doppler Ultrasonographic Study of the Canine Testis. *Reprod Domest Anim.* 47(4):655–659. doi:10.1111/j.1439-0531.2011.01937.x.

Carvalho CF, Chammas MC, Cerri GG. 2008. Princípios físicos do Doppler em ultrasonografia. *Ciência Rural.* 38(3):872–879. doi:10.1590/s0103-84782008000300047.

Christiansen IJ. 1984. Andrology of the Normal Male. In: Christiansen IJ, editor. *Reproduction in the Dog & Cat.* 1st ed. Eastbourne (GB): Baillière Tindall. p. 80–109.

Cunha ICN da. 2008. Exame andrológico do cão Breeding soundness evaluation of male dog. *J Bras Ciência Anim.* 1(1):49–65.

D. Johnston S, V. Root Kustritz M, N. S. Osion P. 2001. Semen collection, evaluation, and preservation. In: *Canine and feline theriogenology.* 1st ed. Philadelphia: Saunders. p. 275–306.

Dziêcio M, Scholbach T, Stańczyk E, Ostrowska J, Kinda W, Woźniak M, Atamaniuk W, Skrzypczak P, Nizański W, Wieczorek A, et al. 2014. Dynamic tissue perfusion measurement in the reproductive organs of the female and male dogs. *Bull Vet Inst Pulawy.* 58(1):149–155. doi:10.2478/bvip-2014-0023.

England GCW, da Silva LDM. 2017. Breeding Soundness Examination and Disorders of Reproduction in Male Dogs. In: Ettinger SJ, Feldman EC, Côté E, editors. *Textbook of Veterinary Internal Medicine.* 8th ed. St. Louis (MO): Elsevier Saunders. p. 1886–1893.

Evans HE, de Lahunta A. 2013. The Urogenital System. In: Evans HE, de Lahunta A, editors. *Miller's Anatomy of the Dog.* 4th ed. St. Louis (MO): Elsevier Saunders. p. 361–405.

Feldman EC, Nelson RW. 2004. Clinical and Diagnostic Evaluation of the Male Reproductive Tract. In: Feldman EC, Nelson R w., editors. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction.* 3rd ed. St. Louis (MO): Elsevier Saunders. p. 5127–5258.

Foresta C, Garolla A, Bettella A, Ferlin A, Rossato M, Candiani F. 1998. Doppler ultrasound of the testis in azoospermic subjects as a parameter of testicular function. *Hum Reprod.* 13(11):3090–3093. doi:10.1093/humrep/13.11.3090.

Freshman JL. 2001. Clinical management of the subfertile stud dog. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 31(2):259–269. doi:10.1016/S0195-5616(01)50204-1. [http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616\(01\)50204-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616(01)50204-1).

Freshman JL. 2002. Semen collection and evaluation. *Clin Tech Small Anim Pract.* 17(3):104–107. doi:10.1053/svms.2002.34326.

Gloria A, Carluccio A, Wegher L, Robbe D, Valorz C, Contri A. 2018. Pulse wave Doppler ultrasound of testicular arteries and their relationship with semen characteristics in healthy bulls. *J Anim Sci Biotechnol.* 9(1):1–7. doi:10.1186/s40104-017-0229-6.

Günzel-Apel AR, Möhrke C, Poulsen Nautrup C. 2001. Colour-coded and pulsed doppler sonography of the canine testis, epididymis and prostate gland: Physiological and pathological findings. *Reprod Domest Anim.* 36(5):236–240. doi:10.1046/j.1439-0531.2001.00288.x.

H. Koziol J, L. Armstrong L. 2018. Society for Theriogenology Manual for Breeding Soundness Examination of Bulls.

H. Mostbeck G, D. Gössinger H, Mallek R, Siostrzonek P, Schneider B, Tscholakoff D. 1990. Effect of Heart Rate on Doppler Measurements of Resistive Index in Renal Arteries. *Radiology.* 175(2):511–513.

Hedia MG, El-Belely MS, Ismail ST, Abo El-Maaty AM. 2019. Monthly changes in testicular blood flow dynamics and their association with testicular volume, plasma steroid hormones profile and semen characteristics in rams. *Theriogenology.* 123:68–73. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.09.032. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.09.032>.

Hoskins PR, Criton A. 2019. Colour Flow. In: Hoskins PR, Martin K, Thrush A, editors. *Diagnostic Ultrasound Physics and Equipment.* 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press Taylor & Francis Group. p. 191–212.

Internationale FC. 2011. Labrador Retriever. FCI-Standard. 122.

J. Parkinson T. 2019. Reproductive Physiology of Male Animals. In: Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW, editors. *Veterinary Reproduction and Obstetrics.* 10th ed. St. Louis (MO): Elsevier Saunders. p. 35–53.

Johnston SD. 1991. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 21(3):545–551. doi:10.1016/S0195-5616(91)50060-7. [http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616\(91\)50060-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616(91)50060-7).

Junior FAB, Junior CK, Fávaro P da C, Pereira GR, Morotti F, Menegassi SRO, Barcellos JOJ, Seneda MM. 2018. Effect of breed on testicular blood flow dynamics in bulls. *Theriogenology.* 118:16–21. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.05.022.

Junqueira LC, Carneiro J. 2013. Aparelho Reprodutor Masculino. In: Junqueira LC, Carneiro J, editors. *Histologia Básica Texto & Atlas.* 12th ed. Rio de Janeiro (BR): Guanabara Koogan. p. 411–426.

Khodamoradi K, Kuchakulla M, Narasimman M, Khosravizadeh Z, Ali A, Brackett N, Ibrahim E, Ramasamy R. 2020. Laboratory and clinical management of leukocytospermia and hematospermia: a review. *Ther Adv Reprod Heal.* 14:263349412092251. doi:10.1177/2633494120922511.

Kumi-Diaka J. 1993. SUBJECTING CANINE SEMEN TO THE I-HYPO-OSMOTIC TEST. *Theriogenology.* 39(6):1279–1289. doi:10.1016/0093-691X(93)90230-3. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X93902303>.

Lung PF, Sidhu PS. 2011. Role of ultrasound in the diagnosis of testicular lesions. *Imaging Med.* 3(5):587–595.

Matton JS, Nyland TG. 2015. Fundamentals of Diagnostic Ultrasound. In: Mattoon JS, Nyland TG, editors. *Small Animal Diagnostic Ultrasound*. 3rd ed. St. Louis (MO): Elsevier Saunders. p. 1–49.

Mattoon JS, Nyland TG. 2015. Prostate and Testes. In: Mattoon JS, Nyland TG, editors. *Small Animal Diagnostic Ultrasound*. 3rd ed. St. Louis (MO): Elsevier Saunders. p. 608–633.

McGowan M. 2019. Evaluation of the Fertility of Breeding Males. In: Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW, editors. *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 10th ed. St. Louis (MO): Elsevier Saunders. p. 619–634.

Oettlé E. 1993. Sperm Morphology and Fertility in the Dog. *J Reprod Fertil.* 47:257–260.

Ortiz-Rodriguez JM, Anel-Lopez L, Martin-Munõz P, Lvarez M, Gaitskell-Phillips G, Anel L, Rodriguez-Medina P, Penã FJ, Ortega-Ferrusola C. 2017. Pulse Doppler ultrasound as a tool for the diagnosis of chronic testicular dysfunction in stallions. *PLoS One.* 12(5):1–21. doi:10.1371/journal.pone.0175878.

Peña Martínez AI. 2004. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim Reprod Sci.* 82–83:209–224. doi:10.1016/j.anireprosci.2004.04.024.

Pinggera GM, Mitterberger M, Bartsch G, Strasser H, Gradl J, Aigner F, Pallwein L, Frauscher F. 2008. Assessment of the intratesticular resistive index by colour Doppler ultrasonography measurements as a predictor of spermatogenesis. *BJU Int.* 101(6):722–726. doi:10.1111/j.1464-410X.2007.07343.x.

Pozor MA, McDonnell SM. 2004. Color Doppler ultrasound evaluation of testicular blood flow in stallions. *Theriogenology.* 61(5):799–810. doi:10.1016/S0093-691X(03)00227-9.

Purswell BJ, Althouse G, Root M. 1992. Guidelines for using the canine breeding soundness evaluation form. *Proc Annu Meet Soc Theriogenology.* 10(January 2010):43–50. doi:10.13140/RG.2.1.2180.1122.

Quintela AT, Oliveira IRS, Souza AO, Gusmão AL, Silva AR. 2010. Water-induced hypo-osmotic test for the evaluation of canine sperm membrane integrity. *Anim Reprod.* 7(2):70–74.

Rehman KU, Zaneb H, Qureshi AB, Yousaf MS, Numan A, Majeed KA, Rabbani I, Khan TM, Rehman H. 2019. Correlation between Testicular Hemodynamic and Semen Quality Indices in Clinical Varicocele Patients in Pakistan. *Biomed Res Int.* 2019. doi:10.1155/2019/7934328.

Robert MA, Jayaprakash G, Pawshe M, Tamilmani T, Sathiyabarathi M. 2016. Collection and evaluation of canine semen - A review. *Int J Sci Environ Technol.* 5(3):1586–1595.

Romano JE, Brinsko SP. 2013. Reproductive Physiology of the Male. In: Klein BG, editor. *Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology*. 5th ed. St. Louis (MO): Elsevier Saunders. p. 451–459.

Ruel Y, Barthez PY, Mailles A, Begon D. 1998. Ultrasonographic evaluation of the prostate in healthy intact dogs. *Vet Radiol Ultrasound*. 39(3):212–216. doi:10.1111/j.1740-8261.1998.tb00342.x.

Salisbury GW, Beck GH, Elliott I, Willett EL. 1943. Rapid Methods for Estimating the Number of Spermatozoa in Bull Semen. *J Dairy Sci*. 26(1):69–78. doi:10.3168/jds.S0022-0302(43)92695-5.

Schurich M, Aigner F, Frauscher F, Pallwein L. 2009. The role of ultrasound in assessment of male fertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 144(SUPPL 1):192–198. doi:10.1016/j.ejogrb.2009.02.034.

Seed J, Chapin RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RH, Hurtt ME, Klinefelter GR, Makris SL, Perreault SD, Schrader S, et al. 1996. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: A consensus report. *Reprod Toxicol*. 10(3):237–244. doi:10.1016/0890-6238(96)00028-7.

Solano-Gallego L, Masserdotti C. 2016. Reproductive System. In: E. Raskin R, J. Meyer D, editors. *Canine and Feline Cytology. A color atlas and interpretation guide*. 3rd ed. St. Louis (MO): Elsevier. p. 313–352.

De Souza MB, Da Cunha Barbosa C, Pereira BS, Monteiro CLB, Pinto JN, Linhares JCS, Da Silva LDM. 2014. Doppler velocimetric parameters of the testicular artery in healthy dogs. *Res Vet Sci*. 96(3):533–536. doi:10.1016/j.rvsc.2014.03.008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.03.008>.

De Souza MB, England GCW, Mota Filho AC, Ackermann CL, Sousa CVS, de Carvalho GG, Silva HVR, Pinto JN, Linhares JCS, Oba E, et al. 2015. Semen quality, testicular B-mode and Doppler ultrasound, and serum testosterone concentrations in dogs with established infertility. *Theriogenology*. 84(5):805–810. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.05.015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.05.015>.

De Souza MB, Da Silva LDM, Moxon R, Russo M, England GCW. 2017. Ultrasonography of the prostate gland and testes in dogs. *In Pract*. 39(1):21–32. doi:10.1136/inp.i6054.

De Souza MB, Mota Filho AC, Sousa CVS, Monteiro CLB, Carvalho GG, Pinto JN, Linhares JCS, Silva LDM. 2014. Triplex doppler evaluation of the testes in dogs of different sizes. *Pesqui Vet Bras*. 34(11):1135–1140. doi:10.1590/S0100-736X2014001100017.

Swanson EW, Bearden HJ. 1951. An Eosin-Nigrosin Stain for Differentiating Live and Dead Bovine Spermatozoa. *J Anim Sci*. 10(4):981–987.

Sweeney TE, Rozum JS, DesJardins C, Gore RW. 1991. Microvascular pressure distribution in the hamster testis. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 260(5 29-5). doi:10.1152/ajpheart.1991.260.5.h1581.

Threlfall WR. 2003. Semen Collection and Evaluation. In: Kustritz MVR, editor. *Small Animal Theriogenology*. 1st ed. St. Louis (MO): Elsevier Science. p. 97–123.

Thrush A. 2019. Spectral Doppler Ultrasound. In: Hoskins PR, Martin K, Thrush A, editors. *Diagnostic Ultrasound Physics and Equipment*. 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press Taylor & Francis Group. p. 171–190.

Tjioe DY, Steinberger E. 1970. A quantitative study of the effect of ischaemia on the germinal epithelium of rat testes. *J Reprod Fertil*. 21(3):489–494. doi:10.1530/jrf.0.0210489.

Trautwein LGC, Souza AK, Martins MIM. 2019. Can testicular artery Doppler velocimetry values change according to the measured region in dogs? *Reprod Domest Anim.* 54(4):687–695. doi:10.1111/rda.13410.

Tsampoukas G, Dellis A, Papatsoris A. 2019. Bilateral disease and intratesticular haemodynamics as markers of dyspermia in patients with subclinical varicocele: A prospective study. *Arab J Urol.* 17(4):298–304. doi:10.1080/2090598X.2019.1647676. <https://doi.org/10.1080/2090598X.2019.1647676>.

Wang T, Liu LH, Luo JT, Liu TS, Wei AY. 2015. A meta-analysis of the relationship between testicular microlithiasis and incidence of testicular cancer. *Urol J.* 12(2):2057–2064. doi:10.22037/uj.v12i2.2726.

Wood MM, Romine LE, Lee YK, Richman KM, O'Boyle MK, Paz DA, Chu PK, Pretorius DH. 2010. Spectral doppler signature waveforms in ultrasonography: A review of normal and abnormal waveforms. *Ultrasound Q.* 26(2):83–99. doi:10.1097/RUQ.0b013e3181dcbf67.

Xu C, Liu M, Zhang FF, Liu JL, Jiang XZ, Teng JB, Xuan XJ, Ma JL. 2014. The association between testicular microlithiasis and semen parameters in Chinese adult men with fertility intention: Experience of 226 cases. *Urology.* 84(4):815–820. doi:10.1016/j.urology.2014.03.021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2014.03.021>.

Yarlagadda P, Willoughby L, Maulik D. 1989. Effect of fetal heart rate on umbilical arterial Doppler indices. *J Ultrasound Med.* 8(4):215–218. doi:10.7863/jum.1989.8.4.215.

Zelli R, Troisi A, Elad Ngonput A, Cardinali L, Polisca A. 2013. Evaluation of testicular artery blood flow by Doppler ultrasonography as a predictor of spermatogenesis in the dog. *Res Vet Sci.* 95(2):632–637. doi:10.1016/j.rvsc.2013.04.023. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.04.023>.

Zeyad A, Amor H, Hammadeh ME. 2017. The impact of bacterial infections on human spermatozoa. *Int J Women's Heal Reprod Sci.* 5(4):243–252. doi:10.15296/ijwhr.2017.43.

5. Anexos

Anexo 1 Resultados do coeficiente de correlação de Spearman e os valores de p entre a percentagem de área vascularizada média de ambos os testículos e os parâmetros avaliados no espermograma.

Variável em estudo	Correlação de Spearman	p
Concentração (Spz/mL)	-0,2264	0,5293
Nº total de Spz	-0,2575	0,4726
% Spz com caudas enroladas no teste hiposmótico	0,2804	0,4327
% Spz com MRP	0,0720	0,8433
% Spz normais	0,2980	0,4031
% Spz vivos	0,2121	0,5564

Spz/mL: concentração de espermatozoides por mililitro de ejaculado; **Nº total Spz:** Número total de espermatozoides na amostra de ejaculado colhida; **% Spz com caudas enroladas no teste hiposmótico:** percentagem de espermatozoides com caudas enroladas no teste hiposmótico; **% Spz com MRP:** Percentagem de espermatozoides com movimento retilíneos e progressivos; **% Spz normais:** percentagem de espermatozoides que apresentaram uma morfologia normal. **%Spz vivos:** percentagem de espermatozoides vivos.

Anexo 2 Resultados do coeficiente da correlação de Spearman e os valores de p entre a percentagem de área vascularizada média de ambos os testículos e os valores das médias dos parâmetros obtidos com recurso ao *Doppler* Pulsado nas artérias testiculares esquerda e direita.

Variável em estudo	Correlação de spearman	p
Região marginal	PSV	-0,1777
	EDV	-0,2410
	PI	-0,0260
	RI	-0,0394
Região suprastesticular distal	PSV	-0,1921
	EDV	0,1743
	PI	-0,2699
	RI	-0,2571
Região suprastesticular média	PSV	-0,3510
	EDV	-0,2379
	PI	0,2052
	RI	0,1393
Região suprastesticular proximal	PSV	-0,2876
	EDV	-0,0188
	PI	0,1310
	RI	-0,1066

PSV: Velocidade no pico da sístole; **EDV:** Velocidade no fim da diástole; **PI:** Índice de pulsatilidade; **RI:** Índice de resistência.